

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Dinámica de cuasiespecies del virus de la fiebre aftosa *in vivo*

Tesis Doctoral

Marta Sanz-Ramos Rojo
Madrid, 2009

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas Marta Sanz-Ramos Rojo
para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.
Madrid, junio de 2009.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” y en el Centro de Investigación en Sanidad Animal, bajo la codirección de la Dra. Noemí Sevilla Hidalgo y del Dr. Esteban Domingo Solans, con financiación por del Ministerio de Educación y Ciencia (beca de Formación de Profesorado Universitario).

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Noemí Sevilla y el Dr. Esteban Domingo por haberme concedido la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral y por su ayuda durante estos años.

A la Dra. Cristina Escarmís por su apoyo y por estar siempre disponible para aconsejarme y ayudarme. Sólo me ha dejado buenos recuerdos. A todos mis compañeros de laboratorio del CBM y del CISA, a los que aún están (Ana, Héctor Tejero, Vero, Julie, Haleh, Héctor Moreno, Eva y Nacho) y a los que ya se han ido (Tania, Clara, Monica K., Gema, Moni, Maca, Juan y Mercedes). Gracias por todo lo que he aprendido con vosotros, el apoyo y comprensión que me habéis ofrecido, y los buenos momentos que hemos vivido. ¡Mil gracias a todos! En particular, quisiera agradecer a Fayna Díaz, Teresa Rodríguez y Samuel Ojosnegros el trabajo compartido; y a Celia Perales, Rubén Agudo y Armando Arias el tiempo que han dedicado a enseñarme diversas técnicas.

A todos los compañeros que, aun siendo de otros laboratorios del CBM o del CISA, me han ayudado y apoyado durante estos años. En especial a Horacio (gracias por todos los plagueos que me has fijado), Mari Ángeles, Eva, Lucy y Jana (¡sois buenísima gente!), Carolina y Esther (por la compañía y por aguantar nuestro desorden), Nereida (¡qué suerte haber coincidido contigo!), a Mar, Vero, Gilberto y Alí (por las divertidas comidas). Gracias también a todos los compañeros de cultivos del CBM. A Carola por su buen humor, Pepa, los chicos del laboratorio 105 y los del 205 del edificio nuevo.

A todos los servicios centrales, especialmente a Mari Ángeles y Alfonso de cultivos del CBM, a Emilio del animalario del CISA, a Tony de seguridad del CISA, y a los chicos de seguridad biológica del CISA por todas las veces que me han esperado para meter o sacar muestras.

Mi estancia en el laboratorio del Dr. Marco Vignuzzi en el "Institute Pasteur" de París fue una experiencia fantástica. Thank you very much, Marco, for sharing with me your knowledge and enthusiasm, and for your support and confidence. Thanks also to Steph, Ana, Carla's and Simon's groups for the warm welcome. You all made me feel at home.

A Ana Grande por sus sabios consejos. Ha sido una suerte conocerte.

A Elena Escudero y Ana Crespo por todo el cariño, ayuda y apoyo. Gracias de todo corazón por estar siempre cerca. Si no fuera por vosotras no estaría aquí.

A mi gran familia y amigos porque, al fin y al cabo, son los que dan sentido a lo que soy y lo que hago. Gracias a todos por vuestra paciencia, compañía, cariño y apoyo. En especial, a mi madre y a mi hermana Silvia porque siempre están y son las que logran que todo encaje. A mi padre por su apoyo y cariño incondicionales, y por su gran perspectiva, que tanto me ha ayudado. A mi hermana Beatriz por hacerme participe de su energía e inocencia. A mi cuñado Ulli por compartir tantos buenos momentos y aguantarme en los no tan buenos. A mi abuela por luchar, luchar y luchar. Me siento orgullosa de ti y muy afortunada. A los Colino por ser tan divertidos y humanos. Me encanta que forméis parte de mi familia. A Lili por escucharme y compartirse. A Encarna, Armando, Moni, Laura, Jose y David por la cálida acogida, y el interés y respeto que han mostrado. A mis tíos Juan y Rosa porque siempre han estado cerca. A mi primo Enrique por cuidarme y preocuparse por mí. A mi tía Blanca por su fuerza, valor y humor. A mi familia Soler Sanz-Ramos por los pequeños grandes momentos. A Eva, por ser mi gran amiga toda la vida. A Armando por la ilusión, complicidad, ayuda y apoyo. Eres sencillamente genial. Muchas gracias a todos.

Abreviaturas

AP	Almohadilla Plantar
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
AZC	5-azacitidina
BHK	Fibroblastos de riñón de hámster
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	DNA copia
<i>cre</i>	Elemento estimulador en <i>cis</i> de la replicación
dATP	2'-Desoxiadenosina-5'-trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con aminoácidos no esenciales, gentamicina y antimicótico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleósido-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EC	Efecto citopático
ECC	Efecto citopático completo
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FA	Fiebre aftosa
FU	5-fluorouracilo
ΔG	Variación de energía libre de Gibbs
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
Hpi	Horas post-inoculación
IFN	Interferón
IMP	Inosín monofosfato
IMPDH	Inosín monofosfato deshidrogenasa
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactósido
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma

IV	Intravenosa
Kb	Kilobases
<i>lacZ</i>	Gen que codifica la β -galactosidasa
LB	Luria-Bertani
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón
LD ₅₀	Dosis letal cincuenta
mdi	Multiplicidad de infección
MPA	Ácido micofenólico
NTP	Ribonucleósido-5'-trifosfato
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas
PEG	Polietilenglicol (pegilado)
PFU	Unidad formadora de placa
PoliA	Polirriboadenilato
PoliC	Polirribocitidilato
R	Ribavirina
RMP	Ribavirina-5'-difosfato
r.m.p.	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RpRd	RNA polimerasa dependiente de RNA
RT	Retrotranscriptasa
RTP	Ribavirina-5'-trifosfato
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción seguida de amplificación por PCR
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
<i>Sn</i>	Entropía de Shannon normalizada
UTR	Región genómica no codificante
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VHA	Virus de la hepatitis A
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VP	Virus de la poliomeilitis

VSV	Virus de la estomatitis vesicular
wt	Wild-type
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido

Nomenclatura de una y tres letras para los aminoácidos

A (Ala), Alanina	M (Met), Metionina
C (Cys), Cisteína	N (Asn), Asparagina
D (Asp), Ácido aspártico	P (Pro), Prolina
E (Glu), Ácido glutámico	Q (Gln), Glutamina
F (Phe), Fenilalanina	R (Arg), Arginina
G (Gly), Glicina	S (Ser), Serina
H (His), Histidina	T (Thr), Treonina
I (Ile), Isoleucina	V (Val), Valina
K (Lys), Lisina	W (Trp), Triptófano
L (Leu), Leucina	Y (Tyr), Tirosina

Índice

1.-Resumen en inglés (Summary).....	1
2.-Introducción.....	3
2.1- Variabilidad genética de virus RNA.....	3
2.1.1- Bases moleculares de la variabilidad genética de lo virus RNA.....	3
2.1.2- Recombinación y reordenamientos génicos.....	4
2.1.3- Estructura poblacional en cuasiespecies.....	5
2.2- Eficacia biológica relativa de virus.....	6
2.2.1- Procesos de ganancia y pérdida de eficacia biológica.....	7
2.3- Virulencia viral.....	10
2.3.1- Determinantes de virulencia.....	11
2.3.2- Relación entre eficacia biológica y virulencia.....	11
2.4- Implicaciones biológicas de la variabilidad genética en las poblaciones virales.....	12
2.5- Mutagénesis letal como estrategia antiviral.....	15
2.5.1- Principales conclusiones de la mutagénesis letal en virus RNA.....	16
2.6- El virus de la fiebre aftosa (VFA) como sistema modelo.....	17
2.6.1- La fiebre aftosa.....	17
2.6.2- Organización genómica y proteínas codificadas por el virus de la fiebre aftosa.....	18
2.6.2.1- Región 5'UTR no codificante.....	19
2.6.2.2- Región codificante del genoma.....	20
2.6.2.3- Región 3'UTR.....	24
2.6.3- Traducción del RNA viral y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral.....	25
2.6.4- Replicación del genoma viral.....	27
2.7- La ribavirina como agente antiviral en infecciones con el virus de la fiebre aftosa.....	27
2.7.1- Posibles mecanismos de acción antiviral de la ribavirina sobre el virus de la fiebre aftosa.....	28

2.7.1.1- Inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenada.....	28
2.7.1.2- Mutagénesis directa del RNA viral.....	29
2.7.1.3- Inmunomodulación.....	31
2.7.2- Resistencia a ribavirina.....	31
2.8- Modelo de ratón.....	31
3.-Objetivos.....	35
4.-Materiales y métodos.....	37
4.1- Animales.....	37
4.2- Células eucariotas y su cultivo.....	37
4.2.1- Congelación de células.....	37
4.2.2- Descongelación de células.....	38
4.3- Virus.....	38
4.4- Infección de animales y preparación de muestras.....	39
4.4.1- Inoculación, monitorización y sangrado de ratones C57BL/6.....	39
4.4.2- Medida del nivel de glucosa en sangre.....	40
4.4.3- Sacrificios, necropsias y preparación de muestras.....	40
4.5- Histopatología.....	41
4.6- Infecciones de células BHK-21 por el VFA.....	41
4.6.1- Infecciones de monocapas celulares en medio líquido.....	41
4.6.2- Infecciones de monocapas celulares en medio líquido en presencia de ribavirina.....	42
4.6.3- Plaqueo de virus en monocapas de células BHK-21 en medio de agar semisólido.....	42
4.6.3.1- Titulación del VFA.....	42
4.6.3.2- Clonaje biológico de un virus.....	43
4.7- Extracción de virus intracelular.....	43
4.8- Extracción de RNA viral.....	44

4.9- Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.....	44
4.10- Purificación de fragmentos de PCR.....	47
4.11- Secuenciación del DNA.....	48
4.12- Cuantificación de moléculas de RNA viral mediante RT-PCR a tiempo real y cálculo de infectividad específica.....	48
4.13- Clonaje molecular.....	49
4.13.1- Clonaje molecular para el análisis de cuasiespecies del VFA.....	49
4.13.2- Construcción de transcritos infecciosos con mutaciones puntuales.....	52
4.14- Transcripción de plásmidos.....	54
4.15- Transfección de células BHK-21.....	54
4.15.1- Transfección con RNA transcrito de clones infecciosos.....	54
4.15.2- Transfección con RNA extraído de poblaciones virales.....	55
4.16- Determinación de la frecuencia de mutación y la entropía de Shannon normalizada de poblaciones del VFA.....	55
4.17- Análisis estructural de las mutaciones encontradas en las secuencias consenso y en los espectros de mutantes de las poblaciones virales estudiadas.....	56
4.18- Análisis estadístico.....	56

5.-Resultados **59**

5.1- Estudio de las propiedades del virus de la fiebre aftosa en infecciones en ratón.....	59
5.1.1- Determinación de la carga viral e infectividad específica del virus de la fiebre aftosa en páncreas de ratón.....	59
5.1.2- Análisis histopatológico de páncreas de ratones inoculados con el virus de la fiebre aftosa.....	63
5.1.3- Pases del virus de la fiebre aftosa en páncreas de ratón <i>in vivo</i>	64
5.1.3.1- Virulencia en ratón de las poblaciones virales aisladas de páncreas.....	64
5.1.3.2- Replicación viral en ratón de los virus procedentes de páncreas.	67
5.1.4- Determinación de cambios genéticos asociados a la replicación de	

VFA C-S8c1 en ratón.....	70
5.1.4.1- Sustituciones de nucleótido encontradas en las poblaciones virales de páncreas.....	70
5.1.4.2- Sustituciones de nucleótido en las poblaciones virales de pulmón, corazón y bazo.....	75
5.1.4.3- Relación entre las sustituciones I85V ó I248T en la proteína 2C y la virulencia del VFA en ratón.....	77
5.1.5- Virulencia en ratón de virus procedentes de bazo y suero.....	79
5.1.6- Diversidad genómica de las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas.....	81
5.1.7- Detección de subpoblaciones de los virus de páncreas con distinta virulencia para ratón.....	84
5.2- Análisis de la virulencia en ratón de poblaciones de VFA mutagenizadas.....	89
5.2.1- Mutagénesis del virus de la fiebre aftosa C-S8c1 con ribavirina.....	89
5.2.2- Virulencia en ratón de poblaciones del virus de la fiebre aftosa obtenidas tras infecciones seriadas en presencia de ribavirina	91
5.2.3- Patogenia en ratón de clones biológicos aislados de la población viral del pase 9 en presencia de ribavirina.....	94
5.2.4- Análisis de las secuencias consenso de virus de la fiebre aftosa sometidos a pases en presencia de ribavirina.....	95
5.2.5- Estudio de la complejidad del espectro de mutantes del virus de la fiebre aftosa sometido a pases en presencia de ribavirina.....	97
5.2.6- Análisis estructural de las mutaciones encontradas en la polimerasa en la cuasiespecie de la población viral del pase 9 en presencia de ribavirina.....	99
6.-Discusión.....	103
6.1- La replicación del VFA en ratón da lugar a la selección de subpoblaciones virales con propiedades fenotípicas alteradas.....	103
6.2- Durante la replicación del VFA C-S8c1 en ratón se seleccionan virus con alteraciones genéticas en las regiones genómicas del <i>cre</i> , L, 2C y 3A.....	105
6.3- Las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas procedentes de un mismo ratón inoculado con VFA C-S8c1 muestran distintos grados de virulencia <i>in vivo</i>	108

6.4- Modelo de la interacción entre diferentes variantes de la cuasiespecie del VFA como determinante de la virulencia <i>in vivo</i>	110
6.5- La complejidad del espectro de mutantes como determinante de virulencia <i>in vivo</i>	113
6.5.1- El tratamiento de poblaciones de VFA C-S8c1 con ribavirina causa un aumento en la complejidad del espectro de mutantes y una disminución de la carga viral.....	114
6.5.2- El incremento en la complejidad del espectro de mutantes del VFA C-S8c1 conduce a la pérdida de virulencia en ratón.....	115
6.6- La supresión de genomas virulentos por genomas atenuados en una población del VFA tratada con ribavirina contribuye a la atenuación viral en ratón.....	116
6.7- Las interacciones entre los componentes de la cuasiespecie modulan el desarrollo de las infecciones virales <i>in vivo</i>	118
7.-Conclusiones.....	121
8.-Bibliografía.....	123
9.-Publicaciones.....	143

Sanz-Ramos *et al.* (2008). J Virol **82**, 10465-76

1. Summary

1.-Resumen en inglés (Summary)

RNA virus populations are complex and dynamic distributions of closely related but non-identical genomes termed quasispecies. The types of mutants in a distribution and the interactions among them determine the quasispecies properties as a whole and their survival capacity as a unit of selection. The large heterogeneity in quasispecies, which increases the adaptive potential of viral populations to different environments, is due to the low fidelity of viral RNA polymerases and the lack of error-repair activities during viral replication. Alterations in the resulting high mutation frequency compromises viral survival and adaptation to different selective pressures. There is a new antiviral strategy named lethal mutagenesis based in increasing the mutation frequency to levels incompatible with the viability of viral populations, achieved by replication in the presence of mutagens.

The main aim of this Ph.D. Thesis is to study the biological implications of quasispecies properties in infections *in vivo*, using a mouse model for foot-and-mouth disease virus (FMDV) infections. FMDV causes a lethal systemic infection in C57BL/6 mice, showing high viral loads in pancreas. Viral populations isolated from pancreas after one passage in mice presented an attenuated phenotype for mice, with no lethality even at the highest dose tested. By contrast, virus from serum of the same mice displayed a similar virulence to that of the parental wild-type clone, and virus isolated from spleen exhibited an intermediate phenotype. However, viral populations from pancreas, spleen and serum showed indistinguishable consensus genomic nucleotide sequences and average mutant spectrum complexities. We propose a model for these differences in virulence for mice based on the proportion of “pathogenic” and “non-pathogenic” genomes within the quasispecies, and on the molecular interactions between them, without a readily detectable manifestation in the consensus genomic sequence or in the mutant spectrum complexity.

In addition, we describe that an increase in the mutant spectrum complexity, by treatment with the mutagenic agent ribavirin, leads to an attenuation of FMDV populations in mice. Interestingly, the mutagenized viral population contained biological clones which displayed higher virulence for mice than the assembled quasispecies, suggesting that these genomes of higher virulence were suppressed by the surrounding mutant spectrum.

2. Introducción

2.-Introducción

2.1- Variabilidad genética de virus RNA

2.1.1- Bases moleculares de la variabilidad genética de los virus RNA

Los virus son entidades orgánicas compuestas de material genético (DNA ó RNA) y una cubierta proteica llamada cápsida. Algunos virus contienen además proteínas en el interior de la cápsida y pueden presentar una envuelta externa compuesta de lipoproteínas y/o glicoproteínas. Carecen de vida independiente, necesitan replicar en el interior de una célula y utilizar su maquinaria de replicación, perjudicando en muchos casos a su hospedador en este proceso. Los virus cuyo material genético es RNA son los más abundantes de la biosfera, constituyendo más del 70% de los virus patógenos que infectan organismos superiores. Son causantes de un gran número de enfermedades en el hombre como poliomielitis, gripe, dengue, varias formas de hepatitis y SIDA entre otras, así como de enfermedades de gran importancia en sanidad animal como fiebre aftosa (FA), lengua azul y de las llamadas enfermedades “emergentes” entre las que se incluyen las fiebres hemorrágicas asociadas a hantavirus, arenavirus o filovirus (Nichol *et al.*, 1993; Duarte *et al.*, 1994b; Morse, 1994; Murphy, 1994; Weaver, 1998)

Los virus RNA presentan una alta variabilidad genética debida principalmente a la elevada velocidad con la que replican y a las altas tasas de error durante la replicación. En individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) o el virus de la hepatitis C (VHC), se ha determinado que se producen entre 10^{10} - 10^{11} nuevas partículas virales por día (Coffin, 1995; Ho *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1998). Por otro lado, los valores de tasa de mutación estimados para los virus RNA varía entre 10^{-3} - 10^{-5} errores por nucleótido copiado (Batschelet *et al.*, 1976; Drake, 1993; Drake & Holland, 1999; Domingo, 2007) a diferencia de los 10^{-8} - 10^{-11} errores por nucleótido copiado en la replicación del DNA celular (Kunkel & Alexander, 1986; Drake, 1991; Echols & Goodman, 1991). Las principales actividades responsables de las altas tasas de error de los virus RNA son:

- (i) Baja fidelidad de copia de las RNA polimerasas.
- (ii) Ausencia de actividad correctora de errores (actividad exonucleasa 3'→5') de las RNA polimerasas, documentada tanto por métodos bioquímicos (Steinhauer *et*

al., 1992; Coffin *et al.*, 1997) como estructurales (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Hansen *et al.*, 1997; Bressanelli *et al.*, 1999; Ferrer-Orta *et al.*, 2006b).

(iii) Ausencia de mecanismos celulares de reparación post-replicativa que actúen sobre híbridos RNA-DNA o intermediarios replicativos de RNA bicatenario (Friedberg *et al.*, 2006).

2.1.2- Recombinación y reordenamientos génicos

La recombinación es la generación de nuevos variantes virales a través de la combinación de fragmentos genómicos procedentes de distintos virus parentales o de diferentes zonas de un mismo genoma [revisión en (Domingo, 2007)]. Es, por lo tanto, un mecanismo importante de generación de variabilidad, sobre todo para los virus RNA de polaridad positiva, para los que se ha descrito que es un proceso frecuente (Agol, 2006; Simmons *et al.*, 2006). Por ejemplo, para el virus de la fiebre aftosa (VFA), sistema modelo utilizado en esta Tesis Doctoral, se ha estimado que entre el 10% y el 20% de los genomas de la progenie en coinfecciones en cultivo de células son recombinantes (King, 1988; Knowles & Samuel, 2003; Sobrino & Domingo, 2004; Carrillo *et al.*, 2005). La recombinación puede ser homóloga o no homóloga, dependiendo de la identidad de secuencia en los puntos de cruce, y replicativa o no replicativa en función de si se requiere o no la replicación del genoma viral (Agol, 2002; Domingo, 2007). La recombinación replicativa y homóloga es la más frecuente y es la causante de la aparición de virus de alta eficacia biológica a partir de virus parentales de baja eficacia biológica. Se ha asociado a este mecanismo el surgimiento de genomas que causan poliomielitis a partir de cepas atenuadas en individuos vacunados (Gmyl *et al.*, 2003; Rousset *et al.*, 2003; Cherkasova *et al.*, 2005). La recombinación no homóloga es menos frecuente debido a la baja probabilidad de éxito en la generación de genomas viables. No obstante, es un mecanismo importante en el surgimiento de nuevos patógenos (Hahn *et al.*, 1988; Domingo *et al.*, 2004).

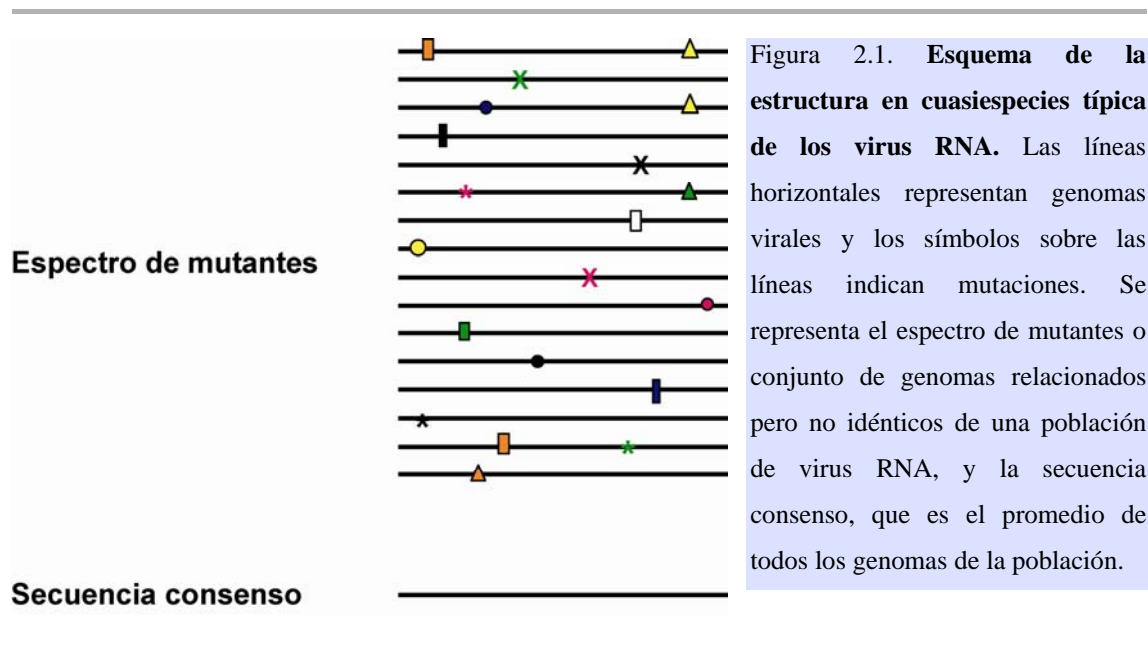
Los reordenamientos génicos en virus de genoma segmentado también son un factor de generación de variabilidad. Las grandes epidemias de gripe a lo largo del siglo XX (las epidemias de 1918, 1957 y 1968) se han asociado a reordenamientos de segmentos entre las cepas humana y aviar del virus de la gripe (Taubenberger *et al.*, 1997; Webster, 1999; Vana & Westover, 2008).

En conclusión, los procesos de recombinación y reordenamiento de segmentos en virus RNA pueden estar implicados tanto en la emergencia de enfermedades como en el aumento de virulencia de virus patógenos ya existentes.

2.1.3- Estructura poblacional en cuasiespecies

Como consecuencia de la elevada variabilidad viral, las poblaciones de virus RNA existen como distribuciones dinámicas de genomas altamente relacionados entre sí pero no idénticos denominadas cuasiespecies (Figura 2.1). Inicialmente, el término cuasiespecie fue propuesto por Manfred Eigen para definir la organización de conjuntos de moléculas autorreplicativas con limitada fidelidad de copia en el posible origen de formas primitivas de vida (Eigen, 1971; Eigen & Schuster, 1979; Eigen & Biebricher, 1988). Las primeras evidencias experimentales de la organización en cuasiespecies de los virus RNA fueron la del fago Q β , la del VFA y la del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Domingo *et al.*, 1978; Domingo *et al.*, 1980; Holland *et al.*, 1982; Sobrino *et al.*, 1983). Posteriormente, todos los virus RNA que se han analizado a nivel poblacional han mostrado un complejo espectro de mutantes sometido a un proceso continuo de variación genética, competición y selección, tal como predice la dinámica de cuasiespecies [revisiones en (Domingo *et al.*, 2003; Domingo, 2006; Domingo, 2007)]. Para algunos virus DNA también se ha descrito una distribución en forma de cuasiespecies (Isnard *et al.*, 1998; López-Bueno *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2007).

La estructura en cuasiespecies condiciona el desarrollo de las infecciones virales que originan. Las cuasiespecies virales se comportan como sistemas complejos (Schuster, 1994): están constituidas por un núcleo de información constante que determina la identidad del sistema y una parte flexible que permite explorar cambios para una mejor adaptación a distintos ambientes (Gell-Mann, 1994; Schuster, 1994; Frank, 1996). Una cuasiespecie está definida por un espectro de mutantes y una secuencia consenso, que es el promedio de todas las secuencias de la población y puede no estar representada como genoma individual dentro de la misma (Figura 2.1). El conjunto de variantes de la población otorga flexibilidad a la cuasiespecie frente a las presiones selectivas externas, permitiendo su adaptación a diferentes ambientes (Borrego *et al.*, 1993; Baranowski *et al.*, 2000; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000; Arias *et al.*, 2004; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005a; Vignuzzi *et al.*, 2006).



2.2- Eficacia biológica relativa de virus

Para los virus RNA, la eficacia biológica relativa es una medida adimensional que determina la capacidad que tiene un variante viral de producir progenie infecciosa con respecto a un virus de referencia dado en un entorno concreto (Holland *et al.*, 1991; Martinez *et al.*, 1991; Domingo & Holland, 1997; Quiñones-Mateu & Arts, 2006). La eficacia biológica, por tanto, se asocia al grado de adaptación de una población viral a un ambiente definido. La eficacia biológica de una población viral depende de los mutantes que la componen y de las interacciones entre ellos, y no tiene por qué coincidir con la eficacia biológica media de sus componentes. Se ha descrito que los mutantes aislados de una cuasiespecie suelen presentar menor eficacia biológica que la población en su conjunto, sugiriendo que establecen una interacción positiva (Domingo *et al.*, 1978; Duarte *et al.*, 1994a). De esta manera, es frecuente observar que la selección de variantes virales a partir de una población dé lugar a subpoblaciones virales con menor eficacia biológica en ausencia de presión selectiva (Borrego *et al.*, 1993; Sierra *et al.*, 2007). No obstante, una cuasiespecie también puede contener clones con valores de eficacia biológica superiores al de la población (de la Torre & Holland, 1990; Duarte *et al.*, 1993). En este caso, los clones con eficacias biológicas superiores estarían suprimidos por el espectro de mutantes circundante. Se ha descrito que para que un

mutante con alta eficacia biológica no se encuentre suprimido por el resto de mutantes y llegue a imponerse en la población, tiene que superar un valor de frecuencia mínimo dentro de la cuasiespecie (de la Torre & Holland, 1990). Las interacciones entre los clones de una cuasiespecie, ya sean de complementación o supresión, se dan en coinfecciones de una célula por dos o más mutantes, favoreciéndose por lo tanto en infecciones con altos tamaños poblacionales. Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la importancia de la complementación y supresión dentro del espectro de mutantes en el desarrollo de las infecciones virales tanto en cultivo de células como *in vivo* (Garcia-Arriaza *et al.*, 2004; Novella *et al.*, 2004; Wilke *et al.*, 2004; Garcia-Arriaza *et al.*, 2005; Domingo, 2006; Vignuzzi *et al.*, 2006; Wilke *et al.*, 2006; Perales *et al.*, 2007).

2.2.1- Procesos de ganancia y pérdida de eficacia biológica

Para diferentes virus RNA, se ha documentado que el tamaño poblacional al que se inician sucesivas rondas de infección en un ambiente constante es determinante en la ganancia o pérdida de eficacia biológica. En pases sucesivos a alta multiplicidad de infección (mdi), en los que participan altos tamaños poblacionales, se produce una ganancia de eficacia biológica (Figura 2.2) (Novella *et al.*, 1995; Sevilla *et al.*, 1998; Escarmis *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2004). Esto sucede debido a que en las sucesivas rondas de replicación una proporción mayoritaria de la población está representada, favoreciéndose de esta manera la generación de un alto número de nuevos variantes, la competición entre ellos y la selección de los más eficaces. El aumento de eficacia biológica de la población puede dar lugar a la fijación de mutaciones en la secuencia consenso, aunque no necesariamente si se produce por un aumento de la eficacia biológica de los componentes del espectro de mutantes sin que exista una dominancia de alguno de ellos sobre el resto.

Cuando en una infección el tamaño poblacional que participa es muy reducido con respecto al tamaño poblacional total, se produce un cuello de botella poblacional, es decir, la replicación al azar de subpoblaciones de genomas independientemente de su ventaja selectiva. Esto puede dar lugar a la fijación de mutaciones no necesariamente adaptativas en la secuencia consenso de la población viral. Dado que la probabilidad de fijar mutaciones deletéreas es mayor que la probabilidad de fijar mutaciones beneficiosas, sucesivos cuellos de botella poblacionales causarán una disminución en la

eficacia biológica (Figura 2.2). Un caso extremo de cuellos de botella sucesivos son los pases placa a placa (repetición seriada de clonajes biológicos) en cultivos celulares, en los que se limita la selección positiva de variantes con mayor eficacia biológica, la selección negativa de virus debilitados y el rescate por recombinación de las secuencias de mayor eficacia biológica, produciéndose una acumulación gradual de mutaciones deletéreas y la consecuente reducción de la eficacia biológica viral. Este proceso se conoce como trinquete de Muller (Muller, 1964) y se ha demostrado que actúa en diversos virus RNA y retrovirus pasados placa a placa (Chao, 1990; Duarte *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1993; Escarmis *et al.*, 1996; Escarmis *et al.*, 1999; Yuste *et al.*, 1999; Yuste *et al.*, 2000; Escarmis *et al.*, 2002; Lázaro *et al.*, 2002; Lazaro *et al.*, 2003; Escarmis *et al.*, 2006; Escarmis *et al.*, 2008).

En trabajos realizados con VSV en cultivos celulares se ha descrito que existe un tamaño poblacional crítico en la transmisión de un virus que no da lugar a cambios netos en la eficacia biológica del virus en pases sucesivos. Con tamaños poblacionales superiores a este valor crítico el virus aumenta su eficacia biológica, mientras que tamaños poblacionales menores causan un cuello de botella que conduce a la pérdida de eficacia biológica de la población. El valor del tamaño poblacional crítico varía linealmente con la eficacia biológica inicial del virus. De esta manera, cuanto mayor sea la eficacia biológica del virus de partida, mayor será el tamaño poblacional necesario para dar lugar a un aumento de eficacia biológica. Del mismo modo, para un virus de baja eficacia biológica se necesita menor número de partículas iniciando las sucesivas rondas de infección para aumentar la eficacia biológica (Novella & Ebendick-Corpus, 2004; Novella *et al.*, 2008).

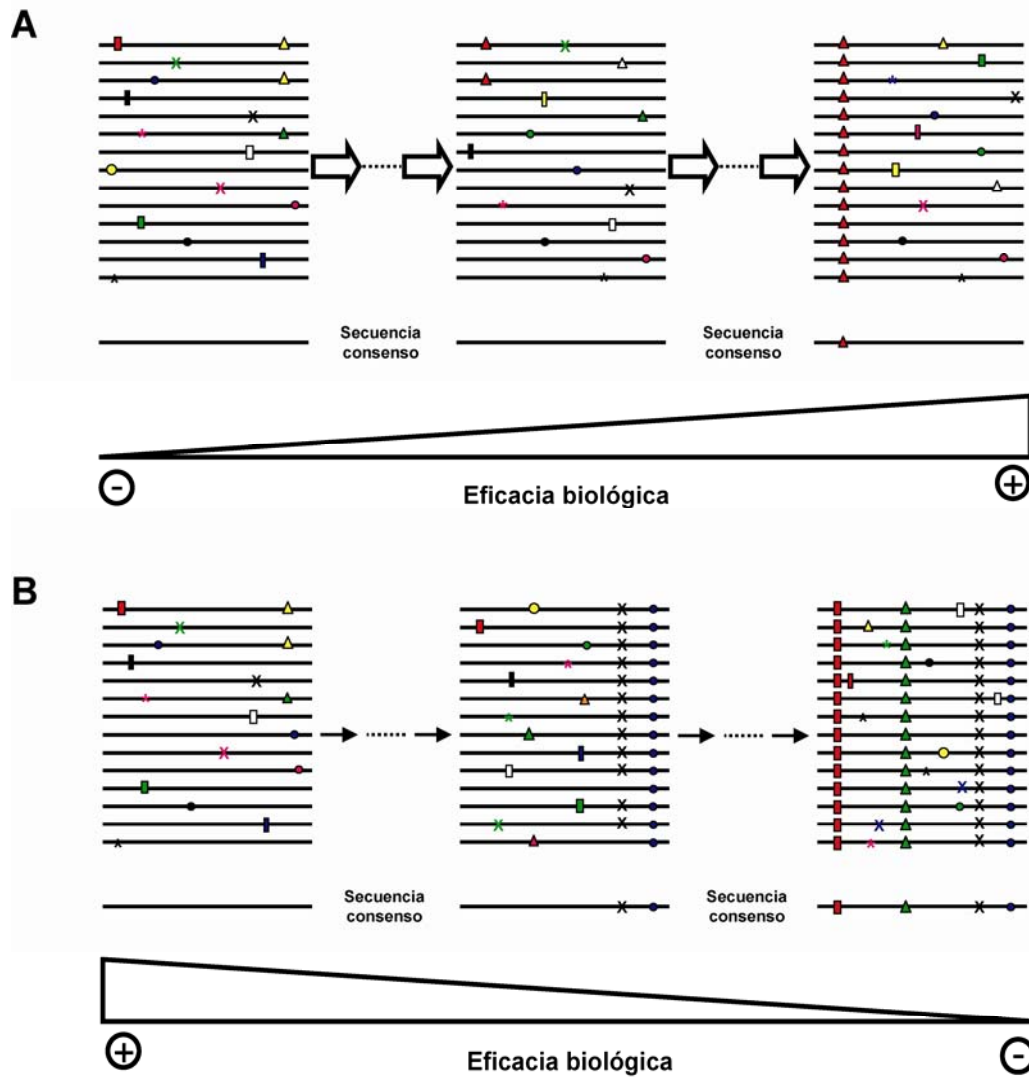


Figura 2.2. **Influencia del tamaño de la población viral replicante en los procesos de ganancia o pérdida de eficacia biológica.** Las líneas horizontales representan genomas virales y los símbolos sobre las líneas indican mutaciones. Se representa la evolución de una cuasiespecie inicial hacia un aumento de eficacia biológica tras sucesivas infecciones con altos tamaños poblacionales (parte A), o hacia una disminución de eficacia biológica cuando es sometida a sucesivos cuellos de botella poblacionales (parte B). Debajo de los espectros de mutantes se muestran las correspondientes secuencias consenso. Parte A, en los pases con altos tamaños poblacionales (flechas anchas) se favorece la optimización de la población viral, como consecuencia de la generación, competición y selección de variantes con mayor eficacia biológica. Esto conduce a un aumento de la eficacia biológica relativa del virus, que puede estar asociada o no a la fijación de mutaciones ventajosas en la secuencia consenso. Parte B, sucesivos cuellos de botella poblacionales (flechas estrechas) dan lugar a la acumulación de mutaciones deletéreas en la secuencia consenso y a la disminución de la eficacia biológica de la población viral.

En experimentos realizados *in vivo* se ha observado que el tamaño de la población viral y la vía de inoculación son determinantes en el desarrollo de las infecciones virales. Así, ensayos realizados con el virus de la poliomielitis (VP) en ratón han puesto de manifiesto que en el tránsito del virus desde el sitio de inoculación hasta los distintos tejidos del hospedador, las presiones selectivas pueden dar lugar a un cuello de botella que resulte en la infección del tejido por un subconjunto de genomas de la población inicial, causando una disminución de diversidad de las poblaciones virales resultantes. Para que este cuello de botella no se produzca se requieren altos tamaños poblacionales en el inóculo inicial (Pfeiffer & Kirkegaard, 2006). Por otro lado, pases seriados del VFA llevados a cabo por contacto entre cerdos infectados y cerdos no infectados dan lugar a la pérdida de eficacia biológica y atenuación del virus en el animal. Se observa, además, correlación entre la pérdida de eficacia biológica y la acumulación de mutaciones en las poblaciones virales, sugiriendo que en las sucesivas transmisiones se produce un cuello de botella poblacional (Carrillo *et al.*, 2007). No obstante, en pases seriados del Virus del Nilo Occidental en pollo, en mosquito, o alternando las infecciones entre estos dos hospedadores, se ha demostrado que inoculando tamaños poblacionales de 100 veces la LD₅₀ del virus en estos animales, se mantiene de media el título viral a lo largo de los pases y no se produce un cuello de botella poblacional (Jerzak *et al.*, 2007; Jerzak *et al.*, 2008).

Otro mecanismo por el cual las poblaciones virales pierden eficacia biológica, pudiendo llegar a extinguirse, es el aumento de la frecuencia de mutación durante la replicación por el tratamiento con agentes mutagénicos. Este proceso se denomina mutagénesis letal (detallado en el apartado 2.5). Se ha documentado que la pérdida de eficacia biológica de estas poblaciones virales se debe a dos factores: i) a la acumulación de mutaciones deletéreas en los genomas virales; ii) a la supresión de genomas con mayor eficacia biológica por genomas de baja eficacia biológica (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004; Gonzalez-Lopez *et al.*, 2005; Grande-Perez *et al.*, 2005a; Grande-Perez *et al.*, 2005b; Perales *et al.*, 2007).

2.3- Virulencia viral

In vivo, la virulencia viral hace referencia a la capacidad de causar enfermedad o muerte del hospedador. Se consideran virus virulentos a aquellos que ocasionan una

enfermedad grave o incluso la muerte del hospedador y virus no virulentos o atenuados a los que no causan enfermedad o causan una enfermedad leve. En cultivo de células, la virulencia se define como el número de partículas infecciosas del virus necesarias para matar un número determinado de células en un tiempo concreto (Sevilla & Domingo, 1996; Herrera *et al.*, 2007).

2.3.1- Determinantes de virulencia

Los genes virales responsables de la virulencia se han clasificado en cuatro grupos (Flint *et al.*, 2009): i) genes que afectan a la capacidad replicativa del virus; ii) genes que mejoran la propagación del virus en el hospedador y entre hospedadores; iii) genes que modifican los mecanismos de defensa del hospedador; iv) genes que influyen en la toxicidad para el hospedador.

En general los determinantes víricos de virulencia son multigénicos y se encuentran concentrados en ciertas regiones genómicas (Emerson *et al.*, 2002; Ebihara *et al.*, 2006; Racaniello, 2006; Herrera *et al.*, 2007). Por ejemplo, en el VFA, se han descrito las siguientes regiones genómicas implicadas en la modulación de la virulencia: el IRES (sitio interno de entrada del ribosoma) (Martínez-Salas *et al.*, 1993), las regiones que codifican las proteínas de la cápsida (Jackson *et al.*, 1996; Baranowski *et al.*, 1998; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2004) y las proteínas no estructurales 2A, 2B, 2C, 3A y 3B (Giraud *et al.*, 1990; Beard & Mason, 2000; Nuñez *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2007) (la estructura del genoma de VFA se detalla en el apartado 2.6.2).

2.3.2- Relación entre eficacia biológica y virulencia

La eficacia biológica definida como la capacidad replicativa de un virus en las células que infecta, y la virulencia como el mínimo número de partículas infecciosas necesarias para que un virus mate a un número concreto de células, a menudo se correlacionan positivamente en virus citopáticos. Esto se debe a que la eficacia biológica está asociada a la acumulación de partículas infecciosas en la célula infectada y su posterior liberación, que con frecuencia causa la muerte de la célula. Se ha descrito una relación directa entre eficacia biológica y virulencia tanto en cultivo de células (Frolov *et al.*, 2001) como *in vivo* (Marks *et al.*, 2005; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005a). Sin embargo, la virulencia no siempre se correlaciona con la eficacia biológica de la

población viral, debido a que la eficacia replicativa de un virus en las células que infecta es solamente uno de los factores que influyen en el desarrollo de una infección viral. Por ejemplo, la capacidad de propagación de un virus de una célula a otra (Escriu *et al.*, 2003; Arien *et al.*, 2006) o las alteraciones de tropismo (Sevilla *et al.*, 2000; Nuñez *et al.*, 2001; Vignuzzi *et al.*, 2006) pueden afectar a la patogenicidad que causa el virus en el hospedador. Recientemente, ensayos con el VFA en cultivo de células han permitido describir las bases moleculares de la falta de correlación entre eficacia biológica y virulencia en un ambiente biológico concreto. En este estudio se observó una drástica pérdida de eficacia biológica, pero no de virulencia, en virus pasados placa a placa. El análisis molecular de estos virus mostró que los determinantes de virulencia se concentran en regiones concretas del genoma, mientras que la pérdida de eficacia biológica está asociada a la acumulación de mutaciones a lo largo de todo el genoma (Herrera *et al.*, 2007).

Del mismo modo que la eficacia biológica, la virulencia de una población viral con estructura en cuasiespecies depende de las interacciones entre los componentes del espectro de mutantes. Por lo tanto, una población viral puede contener genomas de menor y de mayor virulencia que, a su vez, pueden presentar menor o mayor eficacia biológica que la población en su conjunto. En una misma población del VFA se han distinguido mutantes con dos estrategias de infección diferentes: i) genomas adaptados a maximizar los recursos de una célula, produciendo un número elevado de partículas infecciosas en cada célula que infectan, pero comprometiendo el tiempo que tardan en matar a la célula; ii) genomas adaptados a matar a la célula en el menor tiempo posible comprometiendo la producción de partículas virales infecciosas (Ojosnegros, 2009). Asimismo, en experimentos realizados con el virus de la polihedrosis nuclear, se ha observado que el virus que se transmite de un hospedador infectado a otro susceptible a tiempos tempranos post-infección es más virulento y menos productivo que el virus transmitido a tiempos tardíos (Cooper *et al.*, 2002).

2.4- Implicaciones biológicas de la variabilidad genética en las poblaciones virales

La elevada diversidad genética inherente a las cuasiespecies confiere a las poblaciones virales un gran potencial de adaptación a distintos ambientes. Las

consecuencias biológicas más destacables de esta alta variabilidad son: escape a la presión inmune (anticuerpos o células citotóxicas, entre otros), resistencia a inhibidores virales, alteraciones de tropismo, cambios de virulencia, y emergencia y reemergencia de enfermedades virales (Figlerowicz *et al.*, 2003; Domingo, 2006; Domingo, 2007).

Una cuasiespecie puede contener múltiples variantes antigénicos que permiten el escape del virus a la respuesta del sistema inmune, favoreciendo el desarrollo de la infección viral en el hospedador (Carman *et al.*, 1990; Fujii *et al.*, 1992; Weiner *et al.*, 1992; Borrow *et al.*, 1997). En ensayos con el VFA en cultivo de células se han descrito un gran número de mutantes de escape a la acción neutralizante de anticuerpos (Mateu *et al.*, 1988; Mateu *et al.*, 1989; Mateu *et al.*, 1990; Borrego *et al.*, 1993). Esto condiciona el desarrollo de vacunas y determina, en muchos casos, la necesidad de actualizar la composición de las mismas (Domingo *et al.*, 1997; Webster, 1999).

Los mutantes de resistencia o de menor sensibilidad a agentes antivirales surgen como consecuencia de la alta variabilidad de las cuasiespecies, pudiendo llegar a imponerse durante la replicación de la población viral en presencia del agente antiviral (Coffin, 1995; Domingo *et al.*, 2001; Pariente *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2007). Su frecuente aparición ha estimulado la búsqueda de tratamientos antivirales alternativos (Pariente *et al.*, 2001; Grande-Perez *et al.*, 2002; Pariente *et al.*, 2005).

Las alteraciones de tropismo afectan al patrón de las infecciones virales *in vivo* y a la patogenia viral asociada. Se han relacionado expansiones de tropismo *in vivo* con aumento de la virulencia del virus en el hospedador (Schuitemaker *et al.*, 1992; Bjorndal *et al.*, 1997; Lopez-Bueno *et al.*, 2008) y reducciones de tropismo con atenuación del virus (Vignuzzi *et al.*, 2006). Los cambios de tropismo de un tipo celular a otro pueden desencadenar infecciones de distinto grado de virulencia. En el virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV), por ejemplo, la modificación de tropismo compromete el establecimiento de persistencia (Sevilla *et al.*, 2000). Los cambios o expansiones de tropismo se pueden producir como consecuencia de pocas sustituciones de aminoácidos en proteínas virales. Este es el caso de la expansión de tropismo asociada a la adaptación de los virus al uso de receptores alternativos a los habituales (De Jong *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1996; Baranowski *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Baranowski *et al.*, 2000; Tatsuo *et al.*, 2000; Baranowski *et al.*, 2001a; Baranowski *et al.*, 2001b; Baranowski *et al.*, 2003; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2004), o de la disminución de la afinidad del virus por su receptor, que puede estar asociada a una expansión de tropismo tisular como ocurre en parvovirus (Rubio *et al.*, 2005;

Lopez-Bueno *et al.*, 2006; Lopez-Bueno *et al.*, 2008), o a una alteración del tropismo como es el caso de LCMV (Ahmed *et al.*, 1991; Matloubian *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1998; Sevilla *et al.*, 2000). Sin embargo, no sólo se han documentado determinantes de tropismo en las regiones genómicas que codifican las proteínas estructurales del virus, sino que estos determinantes también se pueden localizar en proteínas no estructurales o en regiones genómicas no codificantes (Shiroki *et al.*, 1997; Nuñez *et al.*, 2001; Harris & Racaniello, 2005).

Del mismo modo, los cambios de virulencia se asocian en numerosas ocasiones a uno o pocos cambios de nucleótido localizados en regiones codificantes (Harris & Racaniello, 2003; Herrera *et al.*, 2007) o en regiones no codificantes (Martinez-Salas *et al.*, 1993; Tu *et al.*, 1995) del genoma viral.

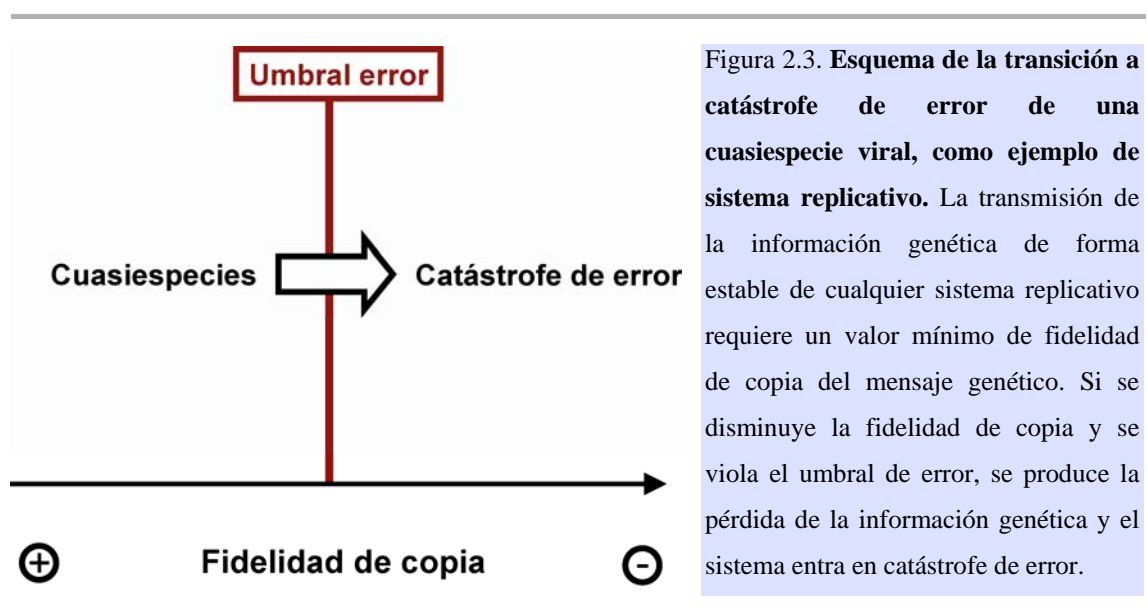
Estos ejemplos ilustran la gran flexibilidad de las cuasiespecies virales frente a las presiones selectivas externas. La alta diversidad genética posibilita la aparición de mutantes que durante la replicación viral pueden dar lugar a subpoblaciones de genomas con propiedades fenotípicas alteradas. La complejidad del espectro de mutantes es, por lo tanto, determinante para la capacidad adaptativa de las cuasiespecies. Existen pruebas experimentales de la influencia de la complejidad del espectro de mutantes en el comportamiento de las poblaciones virales. En pacientes crónicamente infectados con el VHC se ha correlacionado una mayor complejidad de la cuasiespecie con una menor probabilidad de eliminación del virus mediante el tratamiento combinado de interferón α con ribavirina (R) (Pawlotsky *et al.*, 1998; Pawlotsky, 2000; Moreau *et al.*, 2008). Igualmente, en ensayos realizados con un mutante del VP con fidelidad de copia incrementada con respecto al virus parental se demuestra que la disminución en la complejidad de la cuasiespecie compromete la adaptabilidad del virus a ratones susceptibles (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005a; Vignuzzi *et al.*, 2006). En este estudio, el mutante de alta fidelidad replicaba a niveles similares que el virus parental en cultivo de células, pero en infecciones en ratón la menor capacidad de generar diversidad genómica condujo a la pérdida de neurotropismo y a un fenotipo patogénico atenuado. El aumento de la diversidad de la cuasiespecie mediante el tratamiento con agentes mutagénicos restauró el neurotropismo y la patogenia (Vignuzzi *et al.*, 2006).

La emergencia y reemergencia de enfermedades virales son también consideradas consecuencias de la alta variabilidad genética de las cuasiespecies virales, mediada tanto por mutación como por recombinación o reordenamientos génicos. Estas enfermedades son uno de los grandes desafíos actuales en salud pública. Algunos

ejemplos de virus causantes de enfermedades emergentes son el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la gripe que dio lugar a los brotes pandémicos descritos en el apartado 2.1.2 y a la nueva pandemia de 2009, y los virus de las fiebres hemorrágicas Ébola y Lassa, entre otros (Flint *et al.*, 2009).

2.5- Mutagénesis letal como estrategia antiviral

Estudios teóricos predicen que para cualquier sistema replicativo existe una tasa de mutación máxima compatible con el mantenimiento de la información contenida en el genoma replicativo. La transición irreversible hacia la pérdida de información genética se denomina entrada en catástrofe de error y el valor medio de la tasa de mutación crítica a la que se produce la transición es el umbral de error (Swetina & Schuster, 1982; Eigen & Biebricher, 1988; Schuster & Stadler, 1999; Eigen, 2002; Schuster & Stadler, 2008) (Figura 2.3). Los virus RNA replican con una tasa de mutación cercana al umbral de error. Por ello, se está investigando la posibilidad de utilizar agentes mutagénicos para aumentar la frecuencia de mutación y conducir los virus a la extinción (Eigen, 2002). Esta estrategia antiviral se conoce como mutagénesis letal (Loeb *et al.*, 1999).



En ensayos en cultivo de células se ha comprobado con distintos sistemas virales que el tratamiento de virus con mutágenos provoca una disminución de la producción viral o incluso la extinción (Holland *et al.*, 1990; Loeb *et al.*, 1999; Sierra *et al.*, 2000; Crotty *et al.*, 2001; Pariente *et al.*, 2001; Grande-Perez *et al.*, 2002; Airaksinen *et al.*, 2003; Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004). Los agentes mutagénicos más utilizados en estos estudios son la ribavirina (R) (apartado 2.7) y el 5-fluorouracilo (FU).

La mutagénesis letal *in vivo* no se ha investigado tan ampliamente como en cultivo de células. Sin embargo, los estudios realizados hasta ahora apoyan el empleo de mutágenos como estrategia antiviral. Se ha demostrado que el pre-tratamiento de ratones inmunodeficientes con FU evita el establecimiento de una infección persistente de LCMV (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2003). Igualmente, hay evidencias que sugieren que la R, empleada habitualmente en el tratamiento de infecciones por el VHC, actúa como mutágeno sobre este virus (Asahina *et al.*, 2005). No obstante, también hay trabajos que sugieren otros mecanismos de actuación (Chevaliez *et al.*, 2007).

2.5.1- Principales conclusiones de la mutagénesis letal en virus RNA

El tratamiento con mutágenos de diversos virus RNA ha permitido obtener las siguientes conclusiones [revisión en (Domingo, 2005)]:

1. Los agentes mutagénicos FU, R y 5-azacitidina (AZC) pueden provocar la extinción viral en infecciones citolíticas o persistentes en cultivo de células.
2. Una baja capacidad replicativa y bajas cargas virales favorecen la extinción viral en presencia del mutágeno.
3. La combinación de agentes mutagénicos e inhibidores de la replicación viral es más efectiva en producir la extinción del virus que los agentes mutagénicos administrados aisladamente.
4. En el proceso de entrada en catástrofe de error, la infectividad específica de la población viral desciende del orden de 10^2 - 10^3 veces, no se producen cambios en la secuencia consenso y se observan aumentos en la complejidad del espectro de mutantes (medida por comparación de frecuencias de mutación y entropías de Shannon normalizadas).
5. En cultivos celulares, el RNA preextinción (extraído en la última población viral que presenta infectividad en el proceso de mutagénesis letal) interfiere con el RNA infeccioso de la misma población (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004).

6. Evidencias experimentales, apoyadas por un modelo matemático, sugieren que la mutagénesis incrementada favorece la aparición de genomas defectivos (llamados defectores) que interfieren con la replicación de genomas competentes, acelerando el proceso de extinción. A este proceso se le ha llamado defección letal (Grande-Perez *et al.*, 2005b).

Además, en ensayos de interferencia realizados con mutantes defectivos de la cápsida y de la polimerasa del VFA, se ha demostrado que es necesario que éstos conserven su capacidad de replicar para poder interferir al virus estándar (Perales *et al.*, 2007). Estos datos apoyan la importancia de la interferencia ejercida por los genomas defectivos en el proceso de entrada de la población viral en catástrofe de error.

2.6- El virus de la fiebre aftosa (VFA) como sistema modelo

2.6.1- La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a los artiodáctilos (animales de pezuña hendida), entre los que se encuentran animales importantes en ganadería (bovino, porcino y ovino principalmente) [revisiones en (Rowlands, 2003; Sobrino & Domingo, 2004)]. Actualmente, es una enfermedad endémica en la mayor parte de África y Oriente Medio y en algunas regiones de Asia y América del Sur. Sin embargo, eventualmente pueden aparecer brotes en países considerados libres de FA. Es la enfermedad que causa mayores pérdidas económicas a nivel mundial. Por ejemplo, el brote de FA de Reino Unido en 2001 supuso pérdidas estimadas en 30 mil millones de euros (Sutmoller *et al.*, 2003).

El agente causal es el virus de la fiebre aftosa. Es un virus históricamente importante, ya que proporcionó la primera evidencia de enfermedad animal asociada a un agente replicante de tamaño inferior a una bacteria (Loeffler & Frosch, 1898). Existen múltiples vías de transmisión del virus, entre las que se encuentran el contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, etc. El virus penetra en el organismo a través de los epitelios y produce una infección aguda caracterizada por fiebre y ampollas (aftas) en patas, pezuñas, boca y ubres. Al romperse las aftas, los fluidos que se liberan presentan elevadas cargas virales (de aproximadamente 10^8 partículas infecciosas por ml) (Brown, 2004). Durante el desarrollo de un brote de FA no se producen altas tasas

de mortalidad entre los animales adultos (no suele superar el 5% de los animales enfermos), pero sí de morbilidad (Brown, 2004) [revisiones en (Rowlands, 2003; Sobrino & Domingo, 2004)]. Sin embargo, en los animales jóvenes afectados de miocarditis asociada al VFA, la tasa de mortalidad es aproximadamente del 50%. En rumiantes, después de la fase aguda de la enfermedad se puede establecer una infección persistente en garganta y esófago por periodos largos de tiempo sin que se produzcan síntomas clínicos. Estos animales portadores pueden excretar virus capaz de producir infecciones agudas en otros animales, originando nuevos brotes, que dificultan en gran medida el control de la enfermedad (van Bekkum *et al.*, 1959; Pereira, 1981; Gebauer *et al.*, 1988; Salt, 2004).

2.6.2- Organización genómica y proteínas codificadas por el virus de la fiebre aftosa

El VFA pertenece al género aftovirus de la familia *Picornaviridae*. Los picornavirus contienen un genoma RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de alrededor de 8 Kb de longitud, carecen de envuelta y su cápsida es de simetría icosaédrica. Se han descrito siete serotipos diferentes de VFA (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, y Asia1), más de 65 subtipos y un gran número de variantes antigénicos (Pereira, 1981; Carrillo *et al.*, 2005). Esta gran diversidad antigénica, que existe como consecuencia de la alta variabilidad genética del VFA, condiciona la falta de vacunas efectivas contra la enfermedad (Domingo, 1989; Domingo & Holland, 1992; Sobrino & Domingo, 2004).

En nuestro laboratorio, se emplea el VFA C-S8c1 como virus de referencia (en el apartado 4.3 se describe su origen). Pertenece al subtipo europeo C₁ dentro del serotipo C. Posee un genoma de 8115 nucleótidos de longitud, sin contar los tramos homopoliméricos de polirribocitidilato (poliC) y poliadenilato (poliA), que son heterogéneos en longitud (Figura 2.4) (Escarmis *et al.*, 1992; Escarmis *et al.*, 1995; Toja *et al.*, 1999). La región central del genoma comprendida entre los nucleótidos 1039 y 8022 es una zona de lectura abierta que codifica una poliproteína de 2327 aminoácidos que es procesada por proteasas virales durante el ciclo de infección. En los extremos de la molécula de RNA, flanqueando la región codificante, se hallan dos regiones no codificantes (5' UTR de 1038 nucleótidos y 3' UTR de 93 nucleótidos, excluyendo los

tramos homopoliméricos) que contienen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias (Serrano *et al.*, 2006; Flint *et al.*, 2009).

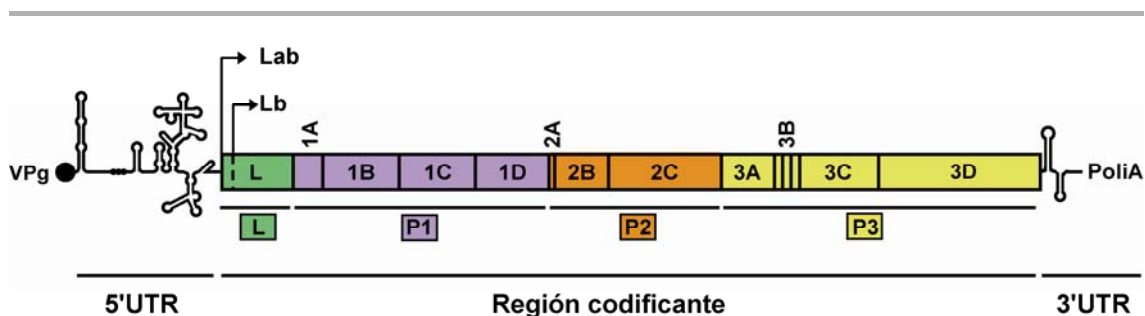


Figura 2.4. **Representación esquemática del genoma del VFA.** El genoma del VFA contiene una región codificante, que codifica una única poliproteína, flanqueada por dos regiones no codificantes altamente estructuradas: 5'UTR en el extremo 5', y 3'UTR en el extremo 3' del genoma. El extremo 5' de la molécula de RNA se encuentra unido covalentemente a un péptido VPg (círculo negro), codificado por la región 3B del genoma. La región codificante del genoma se divide en: la región L que codifica las proteínas Lab y Lb, según comience la traducción en el primer o segundo AUG funcional; la región P1 que codifica las proteínas estructurales; y las regiones P2 y P3 que codifican las proteínas no estructurales del virus.

2.6.2.1- Región 5' UTR no codificante

Esta región está formada por diversas subregiones, que en el sentido 5' al 3' son (Figura 2.5):

1. Fragmento S: comprende 367 nucleótidos y está altamente estructurado. Se encuentra muy conservado entre distintos VFA y diversos estudios sugieren que está implicado en replicación (Belsham, 1993; Serrano *et al.*, 2006).
2. PoliC: presenta una longitud variable de 100 a 400 nucleótidos. Se encuentra en cardiovirus además de aftovirus, pero no en otros picornavirus. Su función es desconocida.
3. Pseudonudos: son tres o cuatro repeticiones de una estructura terciaria típica, cuya función es aún desconocida (Escarmis *et al.*, 1995).
4. Cre: es un elemento de replicación en *cis* para picornavirus. Sirve de RNA molde durante el proceso de uridilación del péptido VPg por parte de la polimerasa del VFA al inicio de la replicación (Mason *et al.*, 2002; Nayak *et al.*, 2005). Para el VFA, sin

embargo, se ha observado complementación de la función de *cre* en *trans* (Tiley *et al.*, 2003), por lo que no es estrictamente requerido en *cis*.

5. IRES: es el sitio interno de entrada del ribosoma. Presenta cinco dominios conservados y está encargado del inicio de la traducción del VFA. El dominio 1 del IRES colocaliza con la secuencia *cre*, siendo incompatible la presencia de ambas estructuras al mismo tiempo. Debe haber un equilibrio entre ambas formas para que sean compatibles la replicación y la traducción (Belsham & Martínez-Salas, 2004).

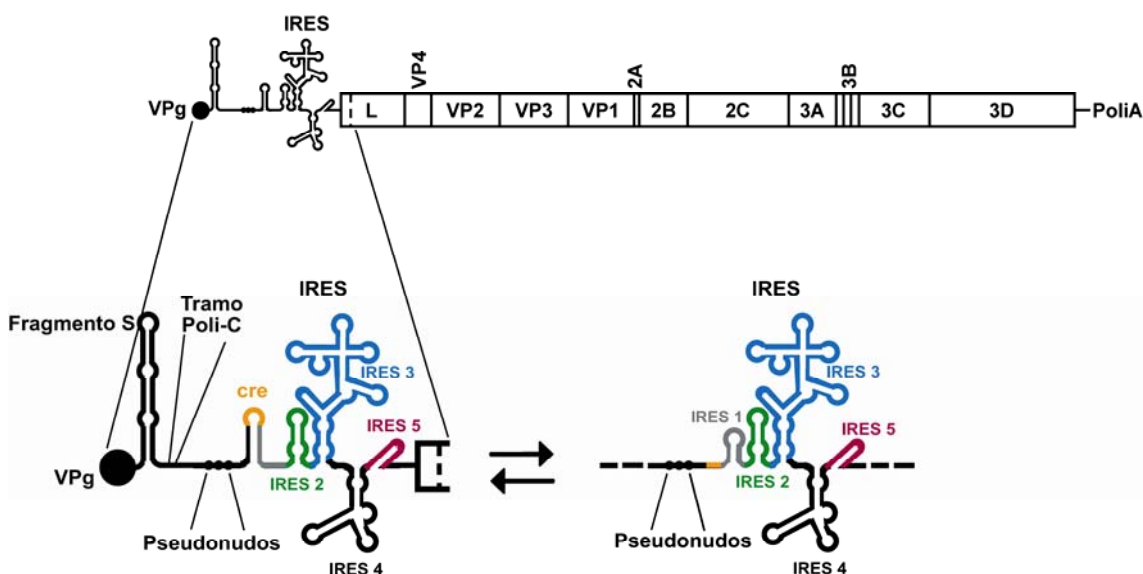


Figura 2.5. **Detalle de la región 5'UTR del genoma del VFA.** Tras el péptido VPg (círculo negro), unido covalentemente al extremo 5' de la molécula de RNA, se encuentran el fragmento S, un tramo de poliC de longitud variable, tres o cuatro pseudonudos, el *cre* y el IRES con cinco dominios conservados (IRES 1-5). La secuencia *cre* (en naranja) colocaliza con el dominio 1 del IRES (en gris), siendo incompatible la presencia de ambas estructuras al mismo tiempo. Se ha sugerido que debe haber un equilibrio entre ambas formas (doble flecha) para que tengan lugar la replicación y la traducción (Belsham & Martínez-Salas, 2004).

2.6.2.2- Región codificante del genoma

La poliproteína está dividida en cuatro regiones que del extremo amino(N)-terminal al carboxilo(C)-terminal son los siguientes:

1. La región L (“Leader”) codifica las proteínas Lab y Lb, según empiece la lectura en el primer o segundo AUG funcional (Devaney *et al.*, 1988). Lab y Lb son dos formas de la proteasa L, que presentan la misma actividad enzimática (Medina *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la síntesis a partir del primer AUG no es necesaria para el desarrollo de la infección de VFA, pero sí a partir del segundo (Cao *et al.*, 1995). L actúa en *cis* y *trans*, cataliza su liberación del resto de la poliproteína y procesa el factor celular eIF4G de iniciación de la traducción dependiente de *cap*, produciendo la parada de la síntesis de proteínas celulares dependientes de *cap* (“shut-off”) y facilitando la traducción de los genomas virales que presentan un IRES (Martínez-Salas *et al.*, 2001; Belsham & Martínez-Salas, 2004). Además, recientemente se ha descrito que la proteasa L está implicada en la inhibición de la respuesta inmune a dos niveles [revisión en (Grubman *et al.*, 2008)]: por un lado, el procesamiento del factor eIF4G bloquea la traducción del mRNA del IFN- α/β (de Los Santos *et al.*, 2006); por otro lado, la translocación de la proteasa L al núcleo inhibe la transcripción del mRNA del IFN β (de Los Santos *et al.*, 2007).

2. La región P1 está compuesta por las regiones genómicas 1A, 1B, 1C y 1D, que codifican las proteínas de la cápsida del virus VP4, VP2, VP3 y VP1, respectivamente. La cápsida de VFA es de simetría icosaédrica y de unos 30nm de diámetro (Figura 2.6). Está formada por 12 pentámeros, cada pentámero por cinco monómeros y cada monómero por una unidad de cada una de las cuatro proteínas de la cápsida (Acharya *et al.*, 1989; Lea *et al.*, 1994). Las proteínas VP2, VP3 y VP1 forman la superficie externa de la cápsida, mientras que VP4 forma la superficie interna y está en contacto con el genoma viral. En la proteína VP1 se encuentra el bucle GH (aminoácidos 133-156) en el serotipo C, desordenado y altamente expuesto al exterior. Este bucle contiene uno de los principales sitios antigénicos del VFA (sitio A) (Mateu *et al.*, 1989; Mateu *et al.*, 1990; Mateu, 1995) y el triplete de aminoácidos RGD de unión a integrinas celulares que actúan como receptores para la entrada del virus (Berinstein *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2002; Baranowski *et al.*, 2003).

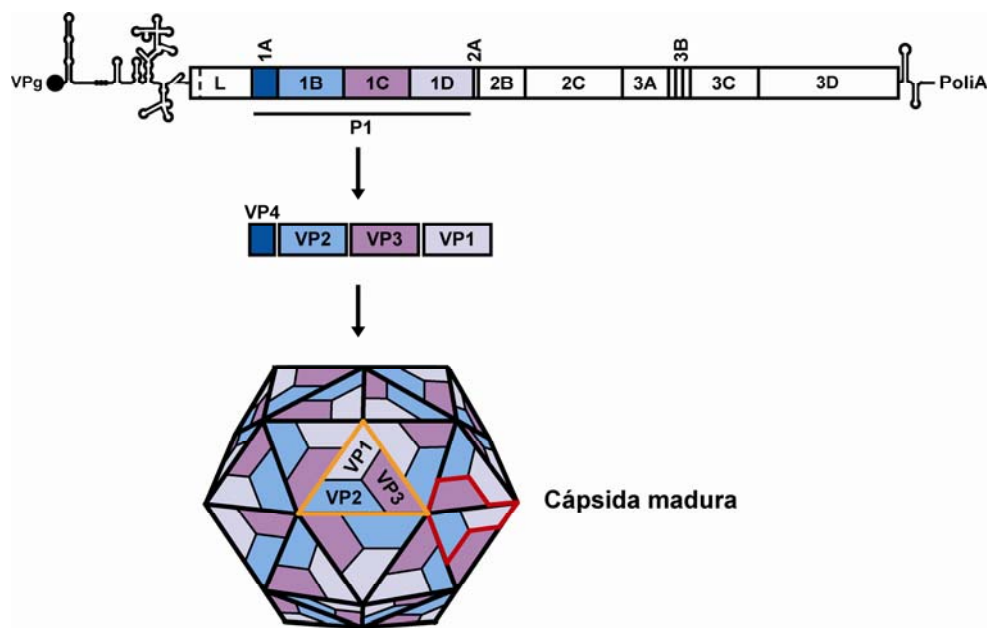


Figura 2.6. **Proteínas y estructura de la cápsida del VFA.** La región genómica P1 se subdivide en cuatro regiones: 1A, 1B, 1C y 1D, que codifican las proteínas maduras de la cápsida del virus VP4 (azul oscuro), VP2 (azul celeste), VP3 (morado oscuro) y VP1 (morado claro), respectivamente. El ensamblaje de una unidad de cada una de estas proteínas da lugar a un protómero. Cinco protómeros constituyen un pentámero y 12 pentámeros conforman la cápsida icosaédrica del VFA. Las proteínas VP2, VP3 y VP1 forman la superficie externa de la cápsida, mientras que VP4 está en la cara interna en contacto con el genoma viral. En el esquema de la cápsida, se resalta en rojo un protómero biológico, que es la estructura proteica que se produce tras la síntesis y procesamiento de la poliproteína viral y en naranja un protómero cristalográfico, que es la unidad estructural mínima de la cápsida que guarda simetría. Ambos protómeros están constituidos por las mismas proteínas, pero con diferente orientación espacial.

3. La región P2 codifica las proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C.

- 2A es un péptido de 16 aminoácidos que cataliza la escisión de P1-2A de 2BC en *cis*, mediante la parada y reiniciación de la traducción por el ribosoma (de Felipe *et al.*, 2003; de Felipe & Ryan, 2004).

- Las proteínas 2B y 2C se encuentran altamente conservadas dentro de la familia *Picornaviridae* (Buenz & Howe, 2006). La proteína 2B junto con la 2C y el precursor de éstas 2BC, en el VFA bloquean la secreción de proteínas (Moffat *et al.*, 2007). Estudios con enterovirus sugieren que 2B puede estar implicada en la permeabilidad de membranas (Van kuppeveld *et al.*, 1997), y en el bloqueo de la secreción de proteínas (Doedens & Kirkegaard, 1995).

- La proteína 2C incluye tres motivos conservados, dos motivos de unión a ribonucleósidos trifosfato (NTPs) denominados A y B, y un motivo que aparece en miembros de la superfamilia 3 de helicasas (motivo C) (Walker *et al.*, 1982; Gorbalenya & Koonin, 1989). Se ha demostrado que la proteína 2C de diversos picornavirus presenta actividad ATPasa y GTPasa *in vitro* (Klein *et al.*, 1999; Pfister & Wimmer, 1999; Samuilova *et al.*, 2006; De Palma *et al.*, 2008), sin embargo, no se ha demostrado actividad helicasa (Rodriguez & Carrasco, 1993; Pfister & Wimmer, 1999). Además, en VP se ha observado que 2C contiene motivos de unión a membrana y a RNA, y que actúa en la replicación del RNA y en la inducción de la proliferación de vesículas de membrana (Bienz *et al.*, 1990; Tolskaya *et al.*, 1994; Rodriguez & Carrasco, 1995; Gromeier *et al.*, 1999; Pfister & Wimmer, 1999). La región genómica 2C de poliovirus también participa en procesos de encapsidación (Vance *et al.*, 1997) y desencapsidación (Li & Baltimore, 1990) del virión. En el VFA, se ha observado que la proteína 2C está implicada en la replicación del RNA (Saunders & King, 1982; Saunders *et al.*, 1985; Pariente *et al.*, 2003; Belsham & Normann, 2008), en la adaptación del virus a cobaya (Nuñez *et al.*, 2001) y en la virulencia viral en las células hospedadoras (Herrera *et al.*, 2007). También se han asociado cambios en la proteína 2C con alteraciones de virulencia y/o adaptación al hospedador en rinovirus (Harris & Racaniello, 2003) y en el virus de la hepatitis A (VHA) (Frings & Dotzauer, 2001; Emerson *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2002).

4. La región P3 codifica las proteínas no estructurales 3A, 3B (VPg), 3C y 3D, muy conservadas en picornavirus:

- 3A está implicada en virulencia y rango de hospedador. Así, se han asociado alteraciones en esta proteína con la atenuación del VFA en bovinos (Giraud *et al.*, 1990; Beard & Mason, 2000; O'Donnell *et al.*, 2001) y con la adaptación de un VFA de cerdo a cobaya (Nuñez *et al.*, 2001). Del mismo modo, en el VHA se han observado mutaciones en 3A relacionadas con la adaptación del virus a cultivo de células (Morace *et al.*, 1993; Graff *et al.*, 1994). Adicionalmente, estudios realizados con el VP han permitido identificar la participación de 3A en la síntesis del RNA viral (Takeda *et al.*, 1986; Gromeier *et al.*, 1999), en el anclaje a membrana del complejo de replicación (Xiang *et al.*, 1998), en el efecto citopático y en la inhibición de la secreción de proteínas (Doedens & Kirkegaard, 1995).

- La región genómica 3B de VFA codifica tres péptidos VPg diferentes, mientras que en el resto de picornavirus sólo hay una copia por genoma (Belsham & Martínez-Salas, 2004). La VPg se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico y actúa de cebador de la replicación y, probablemente, esté también implicada en la encapsidación (Rowlands, 1999; Ferrer-Orta *et al.*, 2006a).
- El precursor 3CD estimula la uridilación de VPg, necesaria para que el péptido actúe de cebador de la replicación (Nayak *et al.*, 2005; Nayak *et al.*, 2006; Agudo *et al.*, 2008).
- 3C es una proteasa que cataliza la mayor parte de los procesamiento proteolíticos de la poliproteína del VFA y es también capaz de inducir la rotura de los factores celulares de iniciación de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham *et al.*, 2000), contribuyendo al “shut-off” de la síntesis de proteínas celulares dependientes de *cap*.
- 3D es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RpRd) encargada de la replicación viral. Su estructura tridimensional es muy similar a las de otras RpRd (Ferrer-Orta *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005; Ferrer-Orta *et al.*, 2006a; Ferrer-Orta *et al.*, 2006b; Ferrer-Orta *et al.*, 2007). Presenta una conformación de mano derecha y cerrada, que contiene cuatro subdominios (Figura 2.7): *fingertips* o “punta de los dedos” (compuesto por los residuos 1-57), *fingers* o “dedos” (residuos 58-207), *palm* o “palma” (residuos 208-248 y 303-343) y *thumb* o “dedo gordo” (residuos 404-470). El subdominio *fingertips* hace de puente entre los subdominios *fingers* y *thumb*, y establece la circularización completa de la estructura. Dentro del subdominio *fingers* se encuentra el motivo F, conservado en todas las RpRd, que forma un túnel cargado positivamente y está implicado en la unión del nucleótido entrante. En el subdominio *palm* se encuentran los motivos A, B, C, D y E, conservados en todas las RpRd, además del centro catalítico del enzima que incluye los residuos D245 (en el motivo A), y D338 y D339 (en el motivo C). Además, la RpRd del VFA carece de un dominio con actividad correctora de errores.

2.6.2.3- Región 3' UTR

La región no codificante 3' UTR está implicada en replicación e infectividad (Saiz *et al.*, 2001). Presenta dos estructuras de tallo-bucle (“stem-loops”) y un poliA de 60-90 nucleótidos que intervienen en la circularización del genoma previa al inicio de la replicación (Serrano *et al.*, 2006).

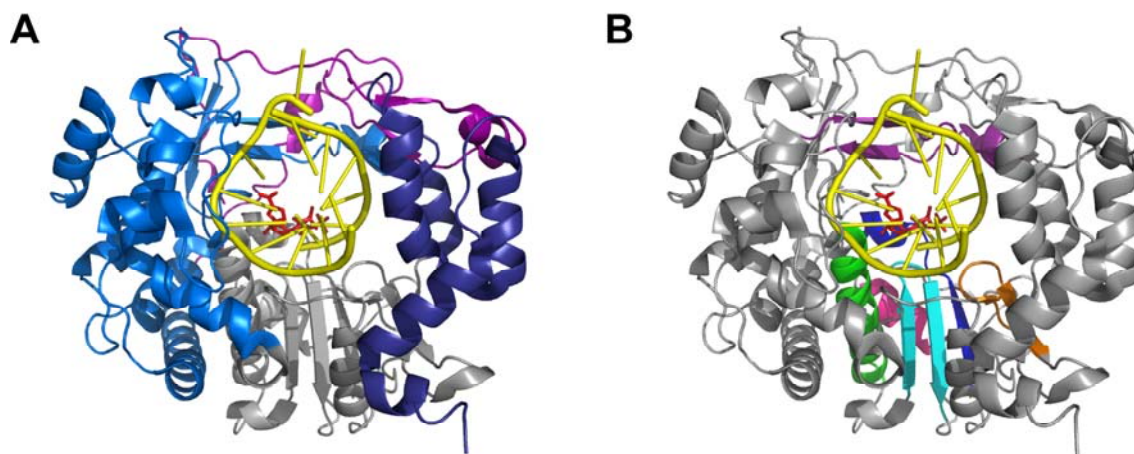


Figura 2.7. Esquema en forma de lazos de la estructura tridimensional de la polimerasa del VFA. Se representa la polimerasa del VFA en complejo con el RNA molde-iniciador de doble banda (en amarillo) y el nucleótido entrante (en rojo). En la parte A, se muestran los dominios de la polimerasa en distintos colores: *fingers* en azul claro, *thumb* en azul oscuro, *palm* en gris y *fingertips* en morado. En la parte B, se resaltan los motivos conservados de los dominios palm (motivos A-E) y fingers (motivo F) de la polimerasa de la siguiente manera: A, en azul marino; B, en verde; C, en azul claro; D, en rosa; E, en naranja; F, en morado. Las estructuras representadas están basadas en (Ferrer-Orta *et al.*, 2007).

2.6.3- Traducción del RNA viral y procesamiento proteolítico de la poliproteína viral

Tras la entrada del VFA en el citoplasma de la célula hospedadora, el RNA se traduce para producir las proteínas necesarias para la replicación del virus y el ensamblaje del RNA en nuevos viriones.

El VFA, así como el resto de picornavirus, carecen de una estructura *cap* en el extremo 5' del genoma. La traducción se produce a partir del IRES (apartado 2.6.2.1) y da lugar a una única poliproteína cuya síntesis comienza en uno de los dos codones de iniciación en la región L del genoma. Una vez sintetizada la proteasa L, se corta a sí misma y procesa el factor celular eIF4G, provocando la parada de la síntesis de proteínas dependientes de *cap* y favoreciendo la traducción de los genomas con IRES (apartado 2.6.2.2).

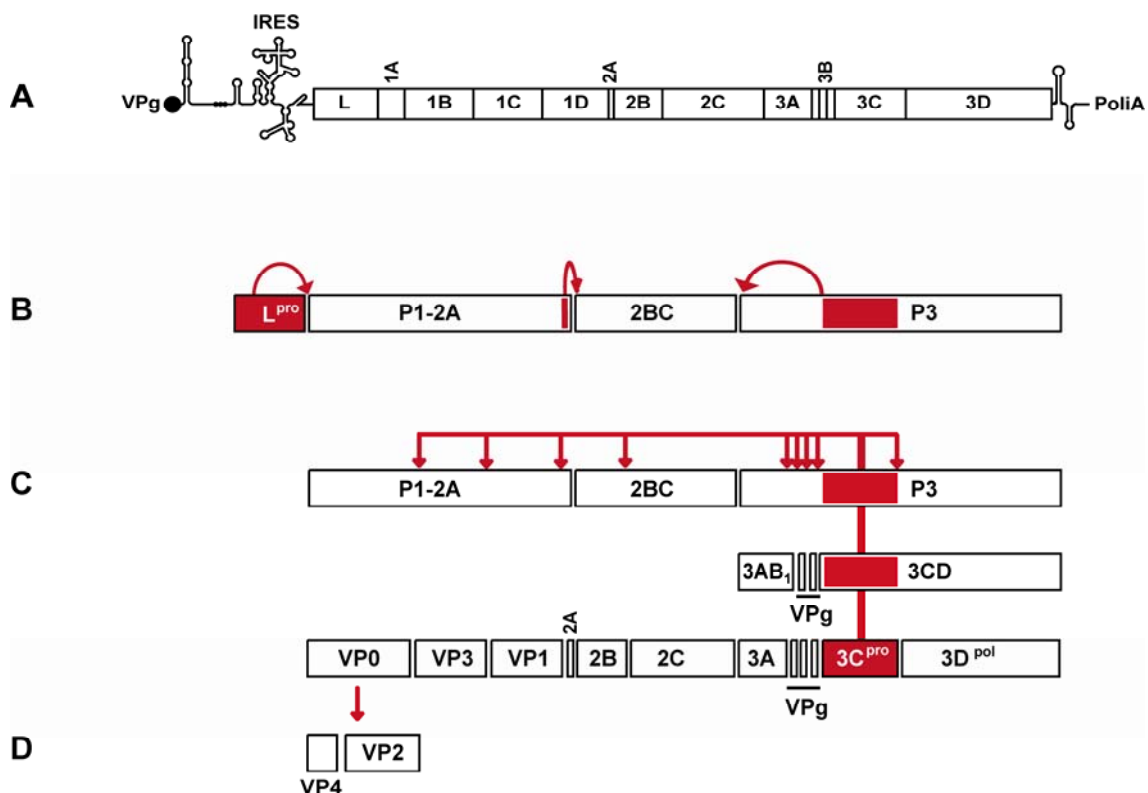


Figura 2.8. **Esquema del procesamiento de la poliproteína viral.** En la parte A, se representa el genoma del VFA. En la parte B, se indican los productos que se generan tras los tres procesamientos en *cis* que tienen lugar a medida que se sintetiza la poliproteína viral. El primer corte se produce por la proteasa L sobre sí misma, liberándose L del resto de la poliproteína. El segundo entre P1-2A y 2BC está mediado por 2A y se produce por la parada y reiniciación de la traducción por el ribosoma. El tercer corte que tiene lugar entre 2BC y P3 está catalizado por P3 cuando la región 3C se sintetiza. En la parte C, se muestran los tres polipéptidos obtenidos tras la síntesis de la poliproteína viral y su procesamiento en *trans* por la proteasa 3C, que da lugar a las distintas proteínas maduras. Algunos productos intermedios del procesamiento, como 3AB₁ y 3CD, son de gran relevancia para la viabilidad del virus. En la parte D, se representa la rotura de VP0 en VP4 y VP2, que es independiente de 3C y se produce durante el ensamblaje de los pentámeros de la cápsida alrededor del genoma.

La poliproteína viral se procesa principalmente por la acción de la proteasa 3C (apartado 2.6.2.2), liberándose las distintas proteínas virales maduras (Figura 2.8). Así, 3C cataliza 10 de los 13 cortes que se producen en la poliproteína viral y participa además en el procesamiento del factor eIF4G (Belsham *et al.*, 2000). Los procesamientos por L y 2A, originan el precursor P1-2A, que se procesa proteolíticamente por 3C, liberándose 2A, VP0 (VP4-VP2), VP3 y VP1. La rotura de VP0 en VP4 y VP2 se produce durante el ensamblaje de los pentámeros de la cápsida

alrededor del genoma, como última fase de maduración de la partícula [revisiones en (Rowlands, 2003; Sobrino & Domingo, 2004)].

2.6.4- Replicación del genoma viral

La replicación del RNA genómico es llevada a cabo por la RpRd codificada por la región 3D del genoma (apartado 2.6.2.2). Para iniciar la replicación, la polimerasa 3D utiliza como cebador el péptido VPg y le añade un residuo de uridina-5'-monofosfato (UMP) a la Tyr que se encuentra en la posición 3 de dicho péptido (Paul *et al.*, 1998; Paul *et al.*, 2003; Nayak *et al.*, 2005; Ferrer-Orta *et al.*, 2006a). Durante el inicio de la síntesis de la cadena positiva se requiere la actuación de la región genómica *cre* como molde del proceso de uridilación (apartado 2.6.2.1). El precursor 3CD actúa estimulando dicha reacción. Sin embargo, en el VP se ha demostrado que la presencia de *cre* no es necesaria para el inicio de la síntesis de la cadena negativa (Murray & Barton, 2003). Varios productos intermediarios del procesamiento de la poliproteína viral intervienen en la replicación del virus [revisiones en (Racaniello, 2001; Semler & Wimmer, 2002; Rowlands, 2003)]. Así, en el VP la polimerasa 3D es reclutada en la membrana por el precursor 3AB (Lyle *et al.*, 2002; Paul, 2002). Según estos datos, se ha propuesto que la replicación de los picornavirus se produce en la cara citoplasmática del retículo endoplasmático, donde se forma un tapiz de polimerasas virales, que posibilita que cada genoma sea copiado por diversas polimerasas, aumentando la eficacia del proceso replicativo (Lyle *et al.*, 2002).

2.7- La ribavirina como agente antiviral en infecciones con el virus de la fiebre aftosa

La ribavirina (R) (1- β -D-ribofuranosil-1*H*-1, 2, 4-triazol-3-carboxamida) es un análogo purínico antiviral de amplio espectro para un gran número de virus RNA y DNA (Figura 2.9) (Wray *et al.*, 1986; Crotty *et al.*, 2000; Crotty *et al.*, 2001; Smee *et al.*, 2001; Crance *et al.*, 2003; Severson *et al.*, 2003; Wyde *et al.*, 2003; Morgenstern *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2007). Actualmente, se emplea para el tratamiento de infecciones por VHC en combinación con interferon- α (Davis *et al.*, 1998; Cummings *et al.*, 2001; Di Bisceglie *et al.*, 2001) o PEG-interferon (Mangia *et*

al., 2005); también se emplea para el tratamiento de infecciones por el virus respiratorio sincitial (Hall *et al.*, 1983; Cooper *et al.*, 2003) y por el virus Lassa (McCormick *et al.*, 1986).

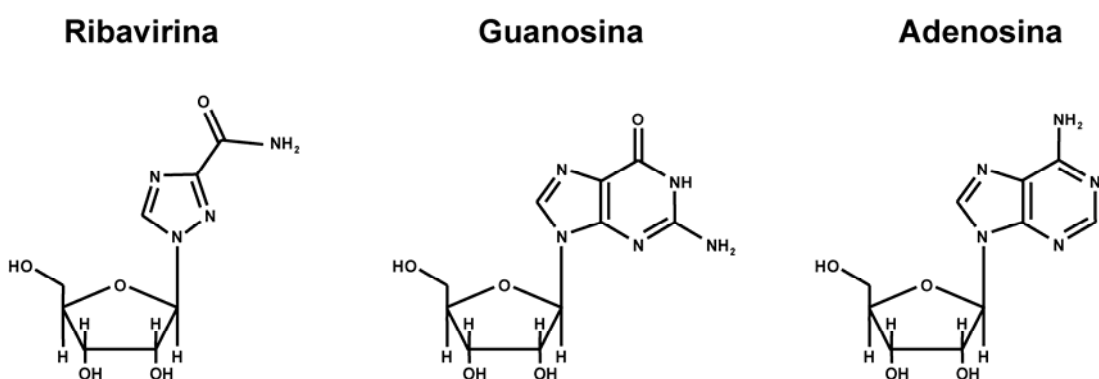


Figura 2.9. **Diagrama de la ribavirina, guanosina y adenosina.** Se representan las fórmulas químicas del análogo purínico ribavirina, y de los nucleósidos guanosina y adenosina.

Para ejercer su actividad antiviral la R debe ser fosforilada dentro de las células. En primer lugar, la adenosina kinasa transforma la R en ribavirina monofosfato (RMP) (Willis *et al.*, 1978), que posteriormente es convertida en ribavirina trifosfato (RTP) por acciones sucesivas de nucleósido mono- y di-fosfato kinasas (Gallois-Montbrun *et al.*, 2003). La fosforilación se produce rápidamente, de manera que tras pocas horas de tratamiento con dosis de 10-100µM de R, la concentración de RTP intracelular alcanza valores similares a la del ATP y GTP en condiciones fisiológicas (Page & Connor, 1990). Se ha observado que RTP es el metabolito intracelular mayoritario de R en células de mamífero (Smee *et al.*, 2001).

2.7.1- Posibles mecanismos de acción antiviral de la ribavirina sobre el virus de la fiebre aftosa

2.7.1.1- Inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa

Uno de los mecanismos de acción antiviral de la R que puede afectar a las infecciones del VFA es la inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) por RMP. La IMPDH cataliza la síntesis de GMP a partir de inosín monofosfato (IMP),

de manera que su inhibición provoca la disminución de los niveles intracelulares de nucleósidos de guanosina (GMP, GDP y GTP). La reducción de los niveles de GTP y el consecuente desbalance en las concentraciones relativas de nucleótidos puede afectar a la replicación viral de dos formas. Por un lado, puede provocar una disminución de la síntesis de RNA y del nivel de traducción de las proteínas virales. Por otro lado, puede favorecer que durante la replicación viral las polimerasas sustituyan el GTP por otros nucleótidos, principalmente ATP y/o RTP como sustrato anómalo. Por lo tanto, durante la replicación viral en presencia de R se pueden producir aumentos en la tasa de error tanto por mutagénesis directa (mediada por la incorporación de RMP) como indirecta (debida al desbalance de nucleótidos intracelulares) (Airaksinen *et al.*, 2003).

2.7.1.2- *Mutagénesis directa del RNA viral*

Se ha descrito en diversos sistemas virales, entre los que se encuentra el VFA, que uno de los principales mecanismos de actividad antiviral de la R se basa en la capacidad de ser incorporada por las RNA polimerasas dependientes de RNA durante la replicación del virus, implicando una actividad mutagénica directa (Crotty *et al.*, 2000; Crotty *et al.*, 2001; Maag *et al.*, 2001; Vo *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2008). La inhibición de la IMPDH puede contribuir a potenciar este efecto mutagénico, reduciendo los niveles de GTP intracelulares y favoreciendo la incorporación de RTP en lugar de GTP durante la síntesis de RNA. Sin embargo, experimentos realizados con células persistentemente infectadas con VFA y tratadas con R, han indicado que la inhibición de la IMPDH no es suficiente para explicar la mutagénesis asociada a la R. Se analizó el efecto de la R en las concentraciones de nucleótidos intracelulares y en la complejidad del espectro de mutantes, tanto en ausencia como en presencia de un suplemento de guanosina que restablecía los niveles intracelulares de GTP. Este mismo ensayo se hizo en paralelo con ácido micofenólico (MPA, un inhibidor de la IMPDH que no se incorpora a ácidos nucleicos) como control. La adición de guanosina al medio de cultivo abolió el efecto mutagénico asociado a MPA, pero no a R (Airaksinen *et al.*, 2003).

La R en su forma trifosfato puede incorporarse durante la síntesis del RNA viral en lugar de GTP o ATP, apareando tanto con la citosina como con el uracilo (Crotty *et al.*, 2002; Sierra *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2008). De esta manera, en un virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, como VFA, el tipo de transiciones que se esperan tras la incorporación de la R son las siguientes (Figura 2.10):

1. Cuando la R se comporta como análogo de guanosina (G), se producen las transiciones $G \rightarrow A$ ó $C \rightarrow U$, cuando se incorpora en la cadena positiva o negativa, respectivamente.
2. Cuando la R se comporta como análogo de adenosina (A), se producen las transiciones $A \rightarrow G$ ó $U \rightarrow C$, cuando se incorpora en la cadena positiva o negativa, respectivamente.

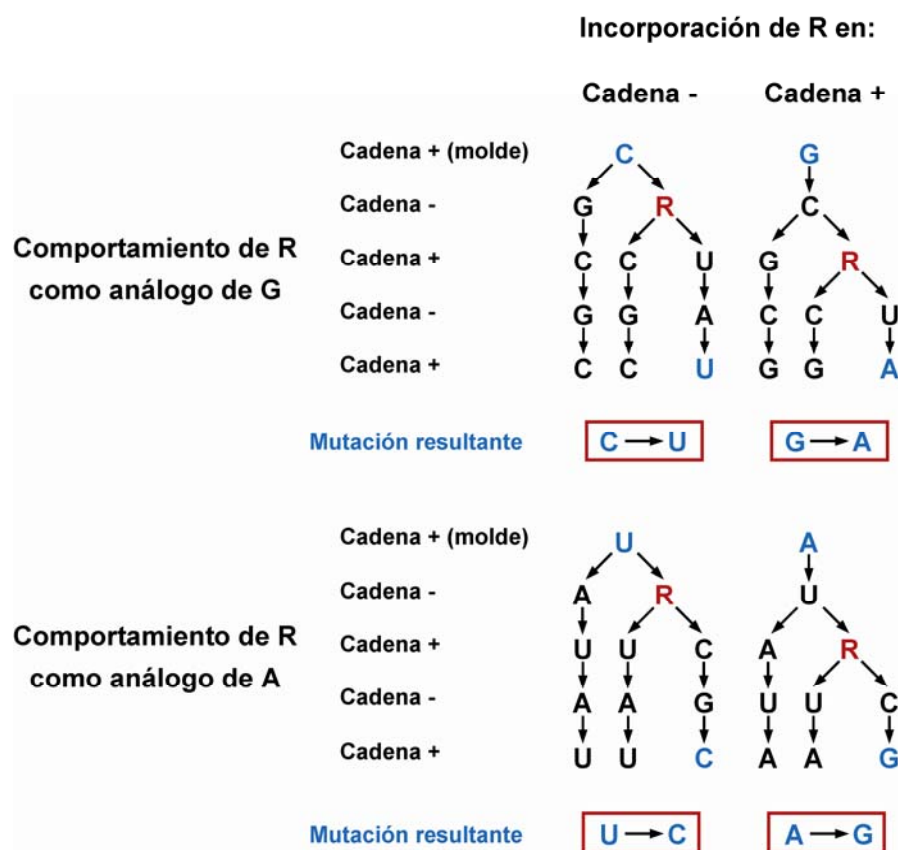


Figura 2.10. **Mutagénesis inducida por la incorporación de la ribavirina en el RNA del VFA.** Se representan las transiciones esperadas en el RNA viral debidas al apareamiento incorrecto de R con C ó U, tanto cuando se incorpora en lugar de A, como cuando se comporta como análogo de G. Los nucleótidos presentes en la cadena positiva (cadena +) o en la cadena negativa (cadena -) se representan con la letra correspondiente a la base nitrogenada. R, indica ribavirina. Se resaltan las bases inicial y final de una vía mutagénica en azul y las mutaciones resultantes mediante rectángulos rojos.

2.7.1.3- Inmunomodulación

Diversos estudios sugieren que la R tiene efectos inmunomoduladores (Peavy *et al.*, 1981; Edell *et al.*, 1998; Parker, 2005). En infecciones virales, por ejemplo, se ha descrito que la R estimula la producción de citoquinas asociadas a linfocitos T-helper 1 y suprime la producción de citoquinas asociadas a linfocitos T-helper 2 (Hultgren *et al.*, 1998; Ning *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1999). Por lo tanto, parte de la actividad antiviral de la R *in vivo* puede deberse a su capacidad inmunomoduladora.

2.7.2- Resistencia a ribavirina

La mutagénesis incrementada provoca la aparición de múltiples mutaciones a lo largo de todo el genoma viral, dando lugar a un gran número de mutantes defectivos que interfieren con los genomas aún viables. Esto hace que las poblaciones virales tratadas pierdan la infectividad antes que la capacidad de replicar (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004; Grande-Perez *et al.*, 2005b). Por tanto, es difícil que un variante resistente a un mutágeno presente una ventaja selectiva frente a los genomas no infecciosos y llegue a imponerse en la población. A pesar de ello, se han documentado virus con mutaciones de resistencia a mutágenos. En concreto, se han descrito mutantes de resistencia, o de menor sensibilidad a la R, en el VHC (Young *et al.*, 2003; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005b), el virus Sindbis (Scheidel *et al.*, 1987), el VP (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003; Arnold *et al.*, 2005) y el VFA (Sierra *et al.*, 2007). La mayoría de estas mutaciones que otorgan resistencia a la R mapean en la región genómica que codifica la polimerasa de los virus (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003; Young *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2005; Sierra *et al.*, 2007), aunque también pueden estar localizadas en otras proteínas virales (Scheidel *et al.*, 1987; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005b).

2.8- Modelo de ratón para el virus de la fiebre aftosa

La amplia caracterización de las propiedades evolutivas del VFA, como sistema modelo de virus RNA, *in vitro* y en cultivos de células (Sobrino *et al.*, 1983; de la Torre *et al.*, 1988; Borrego *et al.*, 1993; Baranowski *et al.*, 2000; Ruiz-Jarabo *et al.*, 2000; Escarmis *et al.*, 2008), contrasta con los limitados estudios realizados *in vivo* y plantea

el interés de profundizar en el análisis de los determinantes evolutivos del VFA en infecciones *in vivo*. Sin embargo, el uso de los hospedadores naturales para el estudio de la patogenia asociada a la infección del VFA entraña gran dificultad y es muy costosa económicamente. Por ello, en nuestro laboratorio se ha establecido un sistema modelo de ratón que permite abordar el estudio de la dinámica evolutiva del VFA en un sistema de mayor complejidad (Salguero *et al.*, 2005). El modelo se ha puesto a punto con ratones hembra adultos C57BL/6. Se ha descrito que estos ratones son altamente susceptibles a la infección con el VFA cuando el virus se administra por vía intraperitoneal o subcutánea, desarrollando alteraciones histopatológicas similares a las observadas en el hospedador natural. Un ejemplo, es la formación de microvesículas cerca de la membrana basal del epitelio, hecho que precede en el hospedador natural al desarrollo de vesículas características de la FA. Además, se ha comprobado que la administración de la vacuna clásica para el VFA, que consiste en virus inactivado, protege al 100% de los ratones frente al desafío con una dosis letal de VFA (Salguero *et al.*, 2005).

Los primeros síntomas clínicos que muestran los ratones inoculados con una dosis letal del VFA son: deshidratación, apatía, postura encorvada y debilitamiento, seguido de síntomas neurológicos tales como ataxia. A los 2-3 días post-infección (pi) los animales mueren. Se detecta virus en suero y en todos los órganos principales: páncreas, bazo, encéfalo, corazón, hígado, riñón, pulmón, timo y nódulos linfáticos, indicando una infección sistémica (Figura 2.11). Asimismo, se observa depleción linfoide en timo y bazo y una severa linfopenia.

En ratones C57BL/6, la dosis letal cincuenta (LD_{50}) del VFA C-S8c1 (virus de referencia de nuestro laboratorio) es 50 PFU (unidades formadoras de placa) (Figura 2.12). Sin embargo, se ha observado que virus mutantes procedentes de la adaptación de C-S8c1 a cultivo de células BHK-21, con mayor eficacia biológica y virulencia que C-S8c1 en este tipo celular, muestran atenuación en ratón. Así, la población viral procedente de 100 pases líticos de C-S8c1 en células BHK-21 presentó una LD_{50} de 10^5 PFU y una población clonal seleccionada por anticuerpos a partir de la población del pase 200 mostró una $LD_{50} > 10^6$ PFU (Salguero *et al.*, 2005). Las características mostradas sobre la infección de ratones C57BL/6 con el VFA, validan el uso de este modelo animal para el estudio de las infecciones del VFA *in vivo*.

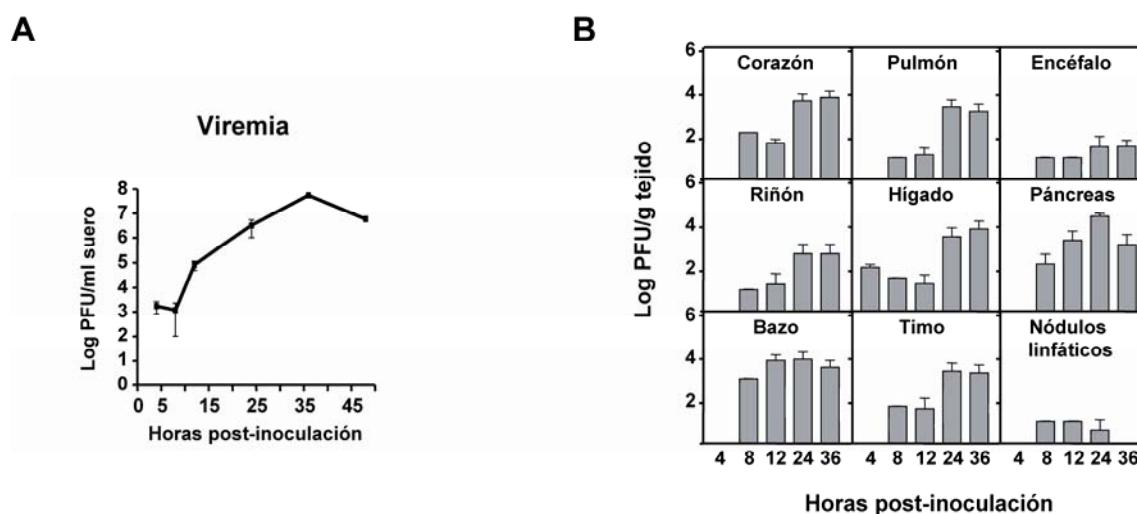


Figura 2.11. Títulos virales en suero y en diversos órganos de ratones C57BL/6 inoculados con una dosis letal de VFA C-S8c1. Los datos mostrados corresponden a las medias de cuatro ratones de ocho semanas de edad inoculados por vía subcutánea en la almohadilla plantar con 10^4 PFU de VFA C-S8c1. La parte A representa la cinética de replicación en sangre. En la parte B, se indica el título viral en corazón, pulmón, encéfalo, riñón, hígado, páncreas, bazo, timo y nódulos linfáticos a distintas horas post-inoculación. Estos datos proceden de (Salguero *et al.*, 2005).

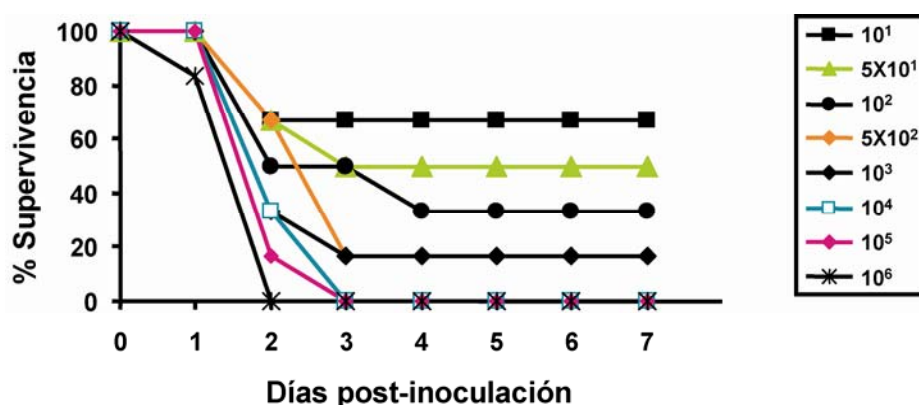


Figura 2.12. Porcentaje de supervivencia de ratones C57BL/6 inoculados con VFA C-S8c1. Se muestran las curvas de supervivencia de grupos de seis ratones de ocho semanas de edad inoculados con dosis crecientes (10 - 10^6 PFU) de VFA C-S8c1 por vía subcutánea en la almohadilla plantar. La LD_{50} de C-S8c1, calculada a partir de estos datos, es 50 PFU (Salguero *et al.*, 2005).

En esta Tesis Doctoral, se ha empleado el modelo de ratón descrito en nuestro grupo para investigar el efecto de la dinámica de cuasiespecies en las propiedades del

VFA tras pases seriados en páncreas, como órgano modelo, y la influencia de las interacciones entre los componentes del espectro de mutantes de la cuasiespecie en la patogenia asociada a la infección viral.

3. Objetivos

3.-Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- 1- Estudio de las propiedades evolutivas del VFA en infecciones *in vivo*. Caracterización genética y fenotípica de las poblaciones virales procedentes de páncreas de ratones C57BL/6 inoculados con VFA C-S8c1. Análisis comparativo a nivel genético y fenotípico de las poblaciones virales aisladas de páncreas, suero y bazo procedentes de un ratón individual inoculado con VFA C-S8c1.
- 2- Determinación del efecto de un aumento en la complejidad del espectro de mutantes del VFA en la patogenia viral en ratón. Estudio de la virulencia en ratón de una población del VFA resultante del tratamiento de C-S8c1 con el agente mutagénico ribavirina y de clones biológicos aislados de la población.

4. Materiales y métodos

4.-Materiales y Métodos

4.1- Animales

En los experimentos descritos en esta Tesis, se emplearon ratones C57BL/6 hembras de 8-10 semanas de edad, adquiridos de Harlan Interfauna Ibérica, S.L. Estos se mantuvieron al menos una semana en el animalario de nivel de bioseguridad 3 del Centro de Investigación en Sanidad Animal (C.I.S.A), INIA, Madrid, antes de ser utilizados, para permitir su aclimatación. Todos los experimentos con animales vivos se llevaron a cabo bajo la normativa de la Comunidad Europea y fueron aprobados en las revisiones del comité ético.

4.2- Células eucariotas y su cultivo

Para las infecciones con el VFA, se utilizó la línea celular establecida BHK-21, que son fibroblastos de riñón de hamster (Stoker & Macpherson, 1964), clonados por dilución límite (de la Torre *et al.*, 1988). Las células BHK-21 se cultivaron en placas (Nunc) hasta la confluencia en presencia de medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco & Freeman, 1959), suplementado con aminoácidos no esenciales (Sigma), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma) y antimicótico (0,00002% de parahidroxibenzoato de butilo) (Sigma) (DMEM), y un 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco). Se incubaron a 37°C, 98% de humedad y 7% de CO₂. Una vez confluentes, se separaron de la placa por tratamiento con tripsina-EDTA [0,5 mg/ml tripsina (Sigma); 0,016% ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Merck); 0,001%, rojo fenol (Merck), diluidos en solución salina tamponada con fosfato (PBS)] durante 2 minutos y se sembraron a la dilución apropiada, nunca más de 20 veces. Las células se pasaron un máximo de 30 veces.

4.2.1- Congelación de células

Para su almacenamiento, las células de una monocapa confluyente se separaron de la placa por tratamiento con tripsina-EDTA, se resuspendieron en DMEM con 5% de SFB y se centrifugaron en un tubo de plástico (Falcon) de 15 ml a 1500 r.p.m. durante 5

minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en una mezcla de 90% de SFB y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma) a una densidad de 10^6 células/ml. Se congelaron en criotubos (Nunc) lentamente a -70°C y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

4.2.2- Descongelación de células

Las células contenidas en criotubos almacenados en nitrógeno líquido, se descongelaron en un baño a 37°C y se transfirieron a tubos de plástico (Falcon) de 15 ml con 10-15 ml de DMEM calentado a 37°C . Se agitaron brevemente y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de DMEM con 10% de SFB para resuspender las células y otros 13 ml de DMEM con 10% de SFB a la suspensión. Las células en suspensión se distribuyeron en placas de 100 mm de diámetro (p100) (Nunc) y se incubaron en las condiciones ya definidas. Cuando alcanzaron la confluencia, se separaron de la placa por tratamiento con tripsina-EDTA y se sembraron a la dilución apropiada.

4.3- Virus

El VFA de referencia del laboratorio es el clon biológico C-S8c1. Se obtuvo en 1970 a partir de lesiones procedentes de un cerdo que presentaba los síntomas de la enfermedad durante un brote de fiebre aftosa en Santa Pau (Girona, España) (Domingo *et al.*, 1980; Sobrino *et al.*, 1983). Se clonó tres veces consecutivas por aislamiento de placa en células BHK-21.

En los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, se ha denominado C-S8c1 al virus obtenido tras dos infecciones líticas sucesivas en células BHK-21 del clon biológico C-S8c1. Estas dos infecciones se realizaron a una mdi de 0,1-1 unidades formadoras de placa (PFU)/célula y se mantuvieron hasta observar efecto citopático completo (ECC).

Se han empleado los siguientes transcritos infecciosos:

- C-S8c1 pMT28: es un virus con la secuencia del genoma de C-S8c1. Se obtuvo tras dos infecciones líticas sucesivas del sobrenadante de la transfección (apartado 4.15) de células BHK-21 con el RNA transcrito (apartado 4.14) a partir del plásmido pMT28, que contiene 35 residuos de citidina en el poliC, 25 adenosinas en el poliA y su secuencia corresponde a la del genoma de C-S8c1 (Toja, 1997).
- C-S8c1 V-85: es C-S8c1 pMT28 con la mutación I85V en la proteína 2C.
- C-S8c1 T-248: es C-S8c1 pMT28 con la mutación I248T en la proteína 2C.

4.4- Infección de animales y preparación de muestras

4.4.1- Inoculación, monitorización y sangrado de ratones C57BL/6

Los ratones se inocularon bien por vía subcutánea en la almohadilla plantar derecha (AP) con un volumen de muestra de 50 µl o bien por vía intravenosa (IV) en la vena caudal con un volumen de 100 µl. Previamente a la inoculación en la AP, los ratones se anestesiaron por inhalación con Isoflurano (IsoFlo, Lab. Dr. Esteve S.A., España). Para las inoculaciones IV, los ratones no se anestesiaron, pero se calentaron con una lámpara de luz infrarroja durante 5-10 minutos para dilatar la vena caudal y facilitar la inyección. Los variantes del VFA inoculados, las dosis y los controles de cada experimento, se detallan en los distintos apartados de Resultados. Antes de ser inoculadas, las muestras se diluyeron convenientemente en PBS ó DMEM, dependiendo del objetivo y de las condiciones utilizadas en cada ensayo.

Los ratones inoculados se monitorizaron para la detección de síntomas clínicos al menos una vez al día, durante los primeros 5 días post-infección. Tras este periodo se monitorizaron una vez cada dos días hasta completar las primeras dos semanas post-inoculación y posteriormente 2 ó 3 veces a la semana hasta la finalización del ensayo.

Para la obtención de suero y detección de viremia, se tomó una muestra de sangre de la vena caudal de los ratones inoculados. Posteriormente, la sangre se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 3 minutos, se recuperó el sobrenadante (suero) y se tituló mediante plaqueo (apartado 4.6.2.1).

4.4.2- Medida del nivel de glucosa en sangre

Para evaluar el metabolismo de la glucosa de los ratones inoculados con el VFA C-S8c1, se midieron los niveles de glucosa en sangre, a días 7, 14 y 21 post-infección, de grupos de ratones infectados con el VFA procedente de páncreas (8 ratones) o inoculados con extracto de páncreas de un ratón naïve (4 ratones, animales control). Los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con una disolución de glucosa al 5% en agua (2 mg de glucosa por g de peso corporal), después de 16 horas de ayuno. Se utilizó *ACCU-CHECK* (Aviva) para medir los niveles de glucosa en la sangre, antes y 60 minutos después de la inoculación de glucosa. Del mismo modo, se midió la concentración media de glucosa en sangre de ratones no inoculados.

4.4.3- Sacrificios, necropsias y preparación de muestras

El sacrificio de los ratones inoculados se llevó a cabo a las 24 horas post-inoculación (hpi). Para ello, se anestesiaron con una dosis sub-letal de pentobarbital sódico (1,5 mg por Kg de peso del animal) (Dolethal), vía intraperitoneal, para acceder a la cavidad torácica, y se perfundieron con PBS o con un cóctel de inhibidores de proteasas (Boehringer Mannheim) al 1% en PBS incompleto, dependiendo del objetivo del experimento. La perfusión se realizó de la siguiente manera: se introdujo una sonda en el ventrículo izquierdo y se seccionó la aurícula derecha, manteniendo el flujo sanguíneo y sustituyendo la sangre por la solución escogida (PBS o el cocktail de inhibidores de proteasas al 1% en PBS). Después del sacrificio se procedió a la necropsia reglada y se extrajeron el bazo, el corazón, el pulmón y el páncreas. Los páncreas extraídos para el análisis histopatológico se conservaron en formol tamponado al 10% (pH 7,2). Las demás muestras, se pesaron y posteriormente se homogeneizaron utilizando un homogeneizador de tejidos *Omni* (Omni International). Una parte de cada órgano se homogeneizó en PBS hasta alcanzar una concentración final de 15% peso/volumen y otra parte se homogeneizó en Trizol (Invitrogen).

4.5- Histopatología

Los páncreas extraídos fijados en formol tamponado al 10% (pH 7,2) para el análisis histopatológico, se deshidrataron a través de series graduadas de alcohol a xilol y se embebieron en cera de parafina. Se cortaron secciones de 4 μm de grosor de los bloques de parafina en un microtomo Leica RM 2135, se montaron en portaobjetos previamente desgrasados y tratados con 3-trietoxisilil-propilamina (Merk), y se secaron en una estufa a 37°C durante 18 horas. Posteriormente, se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina de Harris, que, brevemente, consiste en: eliminar la parafina a través de series graduadas de xilol a alcohol, teñir con hematoxilina y eosina, y deshidratar las muestras con series graduadas de alcohol a xilol. Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje DPX (Casa Álvarez) y se analizaron por microscopía óptica.

4.6- Infecciones de células BHK-21 por el VFA

4.6.1- Infecciones de monocapas celulares en medio líquido

Las infecciones de células BHK-21 en medio líquido se han descrito previamente en (Domingo *et al.*, 1980; Sobrino *et al.*, 1983). Brevemente, monocapas celulares en placas *p100* (6×10^6 células), *p60* (2×10^6 células), *M24* (24 pocillos, 5×10^4 células/pocillo) ó *M96* (96 pocillos, 1×10^4 células/pocillo) (todas de Nunc) se lavaron dos veces con DMEM y se infectaron con 600 μl , 200 μl , 100 μl ó 50 μl de virus, respectivamente. En paralelo, se añadieron placas o pocillos de placas con un volumen igual de DMEM como control negativo, para asegurar la ausencia de contaminaciones. Tras 1 hora de adsorción del virus a las células a 37°C, 7% de CO_2 y 98% de humedad, se retiró el sobrenadante y se añadieron 6 ml, 2 ml, 500 μl ó 100 μl de medio de cultivo con un 1% de SFB, en las placas *p100*, *p60*, o en los pocillos de *M24* ó *M96*, respectivamente. El sobrenadante de la infección se recogió a las 24 post-infección o cuando se observó ECC, dependiendo del objetivo del experimento. Las infecciones seriadas, o pases ciegos, se realizaron recogiendo el sobrenadante de la infección a las 24 horas post-infección y aplicándolo, sin dilución previa, a una nueva monocapa de

células. Las condiciones de infección (mdi, tiempo de recogida del virus, etc.) se detallan en los distintos apartados de Resultados.

4.6.2- Infecciones de monocapas celulares en medio líquido en presencia de ribavirina

Se llevaron a cabo infecciones seriadas con el VFA C-S8c1 de células BHK-21 en medio líquido en presencia de 5 mM del agente mutagénico ribavirina (R) (donación del Dr. J.C. de la Torre, The Scripps Research Institute). Para preparar los medios se partió de una disolución de R en PBS 0,2M, esterilizada por filtración. La disolución de R se diluyó hasta una concentración de 5 mM en medio de cultivo con un 1% de SFB. Se preparó medio fresco en cada pase. Las condiciones para el tratamiento con R se basaron en estudios anteriores sobre toxicidad celular y actividad antiviral específica (Airaksinen *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2007) (Rubén Agudo, datos no publicados). Así, previamente a la infección con el VFA, las monocapas celulares en placas *p60* se preincubaron durante 6-8 horas con el medio de cultivo con un 1% de SFB y R a una concentración de 5 mM, para permitir la absorción del mutágeno y su incorporación a las rutas metabólicas celulares. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con DMEM y se infectaron con el VFA, a una mdi de 0,1 PFU/célula en el primer pase y 200 μ l del sobrenadante de la infección anterior en pases sucesivos. Tras una hora de adsorción del virus a las células a 37°C, 7% de CO₂ y 98% de humedad, se retiró el sobrenadante y se añadieron 2 ml de 5 mM de R en medio de cultivo con 1% SFB. Las infecciones se mantuvieron 24 horas. Siempre se llevó en paralelo una infección en medio DMEM sin R como control. Los virus recogidos fueron titulados mediante plaqueo (apartado 4.6.2.1).

4.6.3- Plaqueo de virus en monocapas de células BHK-21 en medio de agar semisolido

4.6.3.1- Titulación del VFA

El método de plaqueo para la titulación del VFA en medio de agar semisólido en células BHK-21 se ha descrito previamente (Domingo *et al.*, 1980; Sobrino *et al.*,

1983). Se llevó a cabo realizando diluciones crecientes del virus en DMEM e infectando monocapas de células BHK-21 en placas *M6* (6 pocillos, 5×10^5 células/pocillo) (Nunc). Las monocapas celulares se lavaron dos veces con DMEM antes de ser infectadas. Tras una hora de adsorción del virus a las células a 37 °C, 7% de CO₂ y 98% de humedad, se retiró el inóculo y se añadieron 2 ml por pocillo de agar semisólido a una concentración final del 0,5% en medio DMEM, con 1-2% de SFB y 1% de dietilaminoetil (DEAE)-dextrano. Tras 24-30 horas de incubación, dependiendo del variante viral, las monocapas se fijaron con formaldehído al 2% durante 20 minutos y, posteriormente, se tiñeron con cristal violeta (2% cristal violeta en formaldehído al 2%). Se cuantificaron las placas de lisis teniendo en cuenta aquellas diluciones que dieron un número de placas entre 10 y 100, excepto en los plaqu coastos de virus con títulos cercanos al límite de detección, en los que se cuantificaron todas las placas comprobadas por microscopía óptica.

4.6.3.2- *Clonaje biológico de un virus*

Se infectaron monocapas de células en placas *p60* bajo agar semisólido con las diluciones de virus apropiadas para que no hubiera más de 20 placas de lisis por *p60*. Tras 24-30 horas de incubación a 37 °C, 7% de CO₂ y 98% de humedad, se identificaron las placas de lisis de manera visual y utilizando el microscopio óptico. Se seleccionaron únicamente las placas completamente aisladas de placas vecinas. Posteriormente, se extrajo el agar sobre la zona de lisis empleando pipetas *pasteur*, se resuspendió en 500 µl de DMEM y se guardó a -70 °C.

4.7- **Extracción de virus intracelular**

Las monocapas de células BHK-21 infectadas se lavaron una vez con 0,1 M tampón fosfato pH 6.0 para eliminar el virus no adsorbido y tres veces con DMEM. Posteriormente, se añadió medio de cultivo y se lisaron mediante tres ciclos de congelación a -70°C y descongelación a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 3000 r.p.m. para sedimentar los restos celulares y se recogió el sobrenadante.

4.8- Extracción de RNA viral

La extracción de RNA, tanto de tejidos de ratón como de células BHK-21 infectadas, se llevó a cabo por tratamiento con Trizol (Invitrogen). Se procedió de la siguiente manera: se añadió 1 ml de Trizol por cada 50-100 mg de tejido y 0,5 ml de Trizol para cantidades inferiores a 50 mg de tejido. La mezcla se homogeneizó y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de cloroformo por cada 500 µl de Trizol y se agitó con vortex. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó y se recuperó la fase acuosa. A la fase acuosa, se le añadieron 250 µl de isopropanol por cada 500 µl de Trizol. Se recuperó el RNA por centrifugación y se lavó con etanol frío al 75%. Una vez seco, el RNA se resuspendió en 40 µl de EDTA (Merck) 0,5 mM.

La extracción de RNA de infecciones del VFA en cultivo de células, o de clones biológicos, se realizó mezclando un volumen de sobrenadante de células infectadas, o de la suspensión de un clon biológico en DMEM, con 3 volúmenes de Trizol. La mezcla se agitó con vortex y se añadieron dos volúmenes de cloroformo. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó y se recuperó la fase acuosa. Se añadió 1 volumen de isopropanol, se recuperó el RNA por centrifugación y se lavó con etanol frío al 75%. Tras el proceso de secado, el RNA se resuspendió en 20 ó 40 µl de EDTA 0,5 mM, dependiendo de la cantidad de virus que hubiera en la muestra inicial. Todos los RNA se almacenaron a -70°C.

4.9- Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

Las amplificaciones de ácidos nucleicos específicos del VFA se realizaron a partir del RNA extraído de órganos de ratón empleando una dilución de 10^{-1} en agua, o del sobrenadante de células BHK-21 infectadas (sin dilución). El RNA viral se amplificó mediante retrotranscripción seguida de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para la reacción de transcripción reversa (síntesis de cDNA a partir del RNA viral) se empleó la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar *AMV-RT* (Promega). Las reacciones de amplificación para la obtención de secuencias consenso de nucleótidos se llevaron a cabo utilizando la DNA polimerasa termoestable *EHF* (Expand High Fidelity) (Roche) y 40 ciclos de

amplificación. En este caso, la RT-PCR se realizó en un solo paso, siguiendo las instrucciones facilitadas por el suministrador, en el tampón y concentración óptimos para la *EHF*.

En el caso de las muestras con cantidades limitantes de RNA viral (sobrenadante de infecciones virales en células BHK-21 en presencia de ribavirina, clones biológicos y algunos extractos de tejido de ratones infectados con el VFA), las reacciones de RT y PCR se realizaron en dos pasos. Para la reacción de transcripción reversa se utilizó la retrotranscriptasa *Transcriptor* (Roche). Las reacciones de amplificación se realizaron bien con *EHF* para la obtención de secuencias consenso o bien con la DNA polimerasa *PfuUltra* (Stratagene) para clonar los productos de amplificación en *E. coli* y determinar secuencias de clones moleculares (apartado 4.12). La DNA polimerasa *PfuUltra* presenta una fidelidad de copia de $4,3 \times 10^{-7}$ sustituciones por nucleótido copiado y ronda de amplificación (Arezi *et al.*, 2003), lo que reduce la probabilidad de introducir mutaciones durante el proceso de amplificación de PCR previo al clonaje. Se emplearon 30 ciclos de amplificación en las reacciones con la DNA polimerasa *PfuUltra* y 40 ciclos en las reacciones con *EHF*. En todos los casos se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante.

Los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones de RNA por RT-PCR se detallan en la Tabla 4.1.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE [Tris-acetato 40 mM, pH 8,3 (Sigma), EDTA 1 mM (Merck)] y tinción con bromuro de etidio o *SYBR-SAFE* (Invitrogen Molecular Probes).

Tabla 4.1. Oligonucleótidos iniciadores utilizados para la amplificación de RNA viral

Región ^a	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación ^b	Posición ^c
5'UTR	SR3	TTGAAAGGGGCGCTAGGGTC	s	1
	SD4HpaI	GG~TGAAAGGCGGGTTTCGGGTG ^d	a	367
	NR2	TAAGTTTACCGTCTGTCCCG	s	368
	LR1L	CGGAGGTCGGCACCTTTCCTTTAC	s	1002
L	LD5	TGCAGTCCGTGGTAGGAAAAG	a	1116
	LU1	CTACCCATGGACGCCAGACCCG	s	1539
1A (VP4)	4D1New	TTGTTCTGGGTGTTGGTTGTGTG	a	1835
1C (VP3)	3R1EcoR1	CTGGCCGAATTCGACGTGTCGCTG ^e	s	2767
	JD5New	GCACGTACGCCACCATGTACCGAG	a	2926
2B	2BR3	GCCATCAGGACCGGTCTCGATG	s	4027
	2BD1	CGACAAACGTGCTGTCCAGAATCTC	a	4192
2C	2CR1	AGAGCGGGAACGTCCATATTG	s	4580
	2CD2New	GGGCAGTACCAAACAGAATCG	a	4769
	2CR3	GCCTGACCCTGACCACTTCGAC	s	4770
	2CR2	GGCAAACCCCTTCAGCAGTAAG	s	4924
	2CD3	CGCTCACGTGCGATGTCAAAGTG	a	5047
3A	3AR3	GATGACGTGAACTCTGAGCCCGC	s	5704
3C	3CD1	CATGACCATCTTTTGCAGGTCAG	a	6009
	3CR1	CCCCCGTCGTTGGCGTGATTAAC	s	6308
	3'3C	CTCGTGGTGCGGTTACAGGTC	a	6609
3D	N-INFU-PET-3D	GGGTTGATCGTTGATACCAGAG	s	6610
	3DR3	CAAAGATGTCTGCGGAGGACAA	s	6800
	A3	CGTCGACAATGCGAGTCTTGCCG	a	7156
	HindIII-3DMinus	ACGCAGGTAAAGTGATCTGTAGCTTGAATCTCAAAGAGG	a	7992
	Rend	TTT~GGATTAAGGAAGCGGGAAAAGCCC ^d	a	8115

^a Región genómica a la que corresponde el oligonucleótido (las regiones del genoma de VFA se describen en el apartado 2.6.2 de Introducción).

^b Orientación del oligonucleótido iniciador: s significa “sentido” (de la misma polaridad que el RNA genómico del VFA); a significa “antisentido” (de la polaridad de la cadena negativa del RNA del VFA).

^c Se indica la posición en el genoma del VFA C-S8c1 del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido iniciador. La numeración de los residuos corresponde a la descrita en (Escarmis *et al.*, 1996).

^d El signo (~) en la segunda y última secuencias separa las secuencias de nucleótidos del oligonucleótido que no hibridan con el RNA del genoma del VFA (a la izquierda del signo) de las que hibridan con el RNA (a la derecha del signo). En este caso, se indica la posición en el genoma del VFA C-S8c1 del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido, inmediatamente a la derecha del signo (~).

^e Los nucleótidos subrayados son sustituciones en el oligonucleótido con respecto a la secuencia del VFA C-S8c1.

La detección y análisis semicuantitativo de RNA viral en muestras de tejido de ratones de pase 2 (apartado 5.1.3.2) se llevó a cabo mediante la amplificación por RT-PCR de dos regiones genómicas diferentes: región comprendida entre los residuos 2767 y 4192 (abarca parte de VP3, VP1, 2A y 2B), y región comprendida entre los residuos 6308 y 7156 (incluye parte de 3C y 3D) del genoma del VFA [la numeración de los residuos corresponde a la descrita en (Escarmis *et al.*, 1996)]. Las muestras procedentes de cada tipo de tejido se amplificaron en paralelo con diluciones seriadas del RNA de VFA C-S8c1 estándar en el contexto de RNA del correspondiente tejido naïve (no infectado). El número de moléculas de RNA viral de esta mezcla (C-S8c1 en extracto de tejido naïve) fue previamente calculado por RT-PCR a tiempo real (apartado 4.12), y por RT-PCR seguida de electroforesis en gel de agarosa. La cantidad aproximada de RNA viral en las muestras analizadas se determinó por extrapolación de los valores obtenidos en la curva patrón de C-S8c1.

4.10- Purificación de fragmentos de PCR

Con el fin de poder secuenciar los productos de amplificación por PCR, se eliminaron los oligonucleótidos y los dNTPs no incorporados, bien por tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba (Amersham) y exonucleasa I (Amersham) (15 minutos a 37 °C, seguido de 15 minutos a 80 °C para la inactivación de las enzimas) o bien mediante el empleo de filtros *Microcon PCR Centrifugal Filter Devices* (Amicon).

Los productos de amplificación por PCR utilizados para clonaje molecular (apartado 4.13), se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, en tampón TAE. La banda con el tamaño deseado se cortó y el DNA contenido se purificó usando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del suministrador. El DNA se cuantificó por tinción con bromuro de etidio o *SYBR SAFE* (Invitrogen Molecular Probes) en geles de agarosa y comparación de la intensidad de la banda con marcadores de concentración conocida.

4.11- Secuenciación del DNA

La secuenciación de nucleótidos se llevó a cabo mediante técnicas de secuenciación automática del DNA en los secuenciadores ABI PRISM 373, 377, 3700 ó 3730 (Applied Biosystems), utilizando el kit *Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* (Abi Prism; Perkin Elmer). Para el análisis de las secuencias se empleó el programa *Seqman II* (DNA Star 4.0) (Lasergene). Cada secuencia se determinó con al menos dos reacciones independientes de secuenciación, por comparación con la secuencia consenso del virus parental C-S8c1.

4.12- Cuantificación de moléculas de RNA viral mediante RT-PCR a tiempo real y cálculo de infectividad específica

La cuantificación de RNA viral se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando el aparato Light Cycler (Roche). La reacción de RT-PCR se realizó con el kit *Light Cycler RNA Master SYBR Green I* (Roche), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. Se empleó la enzima termoestable *Tth* polimerasa, que presenta actividad retrotranscriptasa y polimerasa (Myers y Gelfand 1991) y permite realizar la RT y PCR en una sola reacción. La región amplificada para la cuantificación de RNA viral fue 2C. Se emplearon los oligonucleótidos 2CR2 y 2CD3 (Tabla 4.1), y 45 ciclos de elongación. El número de moléculas de RNA viral se determinó por extrapolación de los valores de fluorescencia obtenidos en una curva patrón, realizada en paralelo con diluciones seriadas de RNA de pMT28 (apartado 4.3), cuya concentración fue calculada por espectrofotometría mediante densidad óptica a 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa. El RNA de la curva patrón utilizada en la cuantificación de muestras procedentes de infecciones en cultivo de células, se diluyó en RNA de levadura. En cambio, para diluir el RNA de pMT28 utilizado en la cuantificación de RNA viral procedente de un tejido concreto, se utilizó RNA del tejido correspondiente de un ratón no infectado, con el fin de mimetizar el contexto del RNA analizado. Se determinó el número mínimo de moléculas de RNA que pueden ser cuantificadas en estas condiciones experimentales utilizando diluciones seriadas de RNA de pMT28. El límite de detección de esta RT-PCR fue de $1,8 \times 10^2$ moléculas de RNA/ μ l de muestra cuando el RNA de pMT28 estaba diluido en RNA de levadura, y de

$1,0 \times 10^4$ moléculas de RNA/ μ l cuando estaba diluido en RNA de tejido de ratón no infectado.

Se analizaron las curvas de fusión del DNA amplificado para comprobar la especificidad de las reacciones de amplificación. Las curvas de fusión permiten distinguir entre productos de amplificación específica y productos artefactuales de bajo peso molecular (como dímeros de oligonucleótidos), ya que los específicos presentan una temperatura de fusión más alta. Además, en algunos casos, se analizaron los productos de las amplificaciones por electroforesis en geles de agarosa para comprobar que tenían la longitud esperada.

A partir de los valores obtenidos en la RT-PCR a tiempo real, se calculó el número de moléculas de RNA viral por ml de sobrenadante o por gramo de tejido, en las muestras procedentes de cultivo de células o de tejidos de ratón, respectivamente. Para determinar la infectividad específica de los virus procedentes de cultivos celulares o del suero de animales infectados, se dividió el número de PFU/ml de sobrenadante (apartado 4.6.3.1) entre el número de moléculas de RNA/ml de sobrenadante. En el caso de los virus procedentes de tejidos de animales infectados, se dividió el número de PFU/g de tejido entre el número de moléculas de RNA/g de tejido.

4.13- Clonaje molecular

4.13.1- Clonaje molecular para el análisis de cuasiespecies del VFA

A partir del RNA de poblaciones del VFA se realizó la síntesis del cDNA que se quería amplificar. Para ello, se utilizó la retrotranscriptasa *Transcriptor*. La reacción de amplificación se llevó a cabo con la *PfuUltra* DNA-polimerasa para evitar la introducción de mutaciones durante el proceso de amplificación de PCR previo al clonaje (apartado 4.9). Las reacciones de RT y PCR se realizaron con diluciones 1/10 y 1/100 del molde inicial y solamente se clonaron las muestras para las cuales la amplificación de la dilución 1/100 fue positiva. De esta manera, se aseguró un exceso de molde en los productos de amplificación y una representación adecuada de los componentes del espectro de mutantes entre las secuencias determinadas. Los productos de PCR utilizados para el clonaje se purificaron, tal y como se describe en el apartado

4.10. Las poblaciones del VFA analizadas por clonaje molecular se detallan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Poblaciones virales analizadas a nivel de espectros de mutantes

Población viral ^a	Región genómica analizada ^b	Vector de clonaje ^c
Páncreas del ratón # 8	VP1 (3208-3834)	pGEM-T Easy
	2B-3A (4072-5366)	pGEM-4Z
Bazo del ratón # 8	VP1 (3208-3834)	pGEM-T Easy
	2B-3A (4072-5366)	pGEM-4Z
Suero del ratón # 8	VP1 (3208-3834)	pGEM-T Easy
	2B-3A (4072-5366)	pGEM-4Z
C-S8c1	3D (6800-7773)	pGEM-4Z
P9 R	3D (6800-7773)	pGEM-4Z

^a Las poblaciones virales analizadas se describen en los apartados 5.1.5, 5.1.6 y 5.2.1 de Resultados.

^b Se indican las proteínas codificadas por las regiones genómicas analizadas (el genoma del VFA se describe en el apartado 2.6.2 de Introducción). Entre paréntesis se muestran los nucleótidos inicial y final de la región genómica secuenciada. La numeración de los residuos del genoma del VFA es la descrita en (Escarmis *et al.*, 1996).

^c Se indica el vector utilizado en el clonaje molecular

Se siguieron dos estrategias de clonaje, en función del tipo de vector utilizado:

- Se utilizó el vector pGEM-T Easy (Promega) para el clonaje de la región genómica comprendida entre los residuos 2767 y 4192 (que abarca parte de 1C, 1D, 2A y parte de 2B) del genoma del VFA, que se amplificó con los oligonucleótidos *3RIEcoRI* y *2BDI* (Tabla 4.1). Este vector contiene un residuo de timina protuberante en el extremo 3' de ambas cadenas. Por ello, previamente a la reacción de ligación, se llevó a cabo la elongación del producto amplificado por adición de un residuo de adenosina en el extremo 3'. La reacción de elongación ("tailing") se realizó con 5 µl del producto de PCR purificado, 5U de *Taq* DNA polimerasa (Roche), dATP 0,2 mM, MgCl₂ 2,5 mM, en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó durante 15-30 min a 70°C. A continuación, se ligaron 1-2 µl del producto con el vector pGEM-T Easy, empleando T4 DNA ligasa (New England Biolabs), en presencia del tampón suministrado por el

fabricante. La transformación del producto de ligación se realizó por choque térmico en células competentes de *E. coli* DH5 α (Woodcock *et al.*, 1988). Las colonias de bacterias se aislaron en placas Petri con medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook & Russell, 2001) con ampicilina (100 μ g/ml, Sigma), IPTG (400 μ g/ml, Sigma) y X-gal (400 μ g/ml, Sigma). El vector pGEM-T incluye un gen cuya expresión confiere resistencia a ampicilina y el gen *lacZ*, que permite la selección por color en presencia de X-gal e IPTG (Sambrook & Russell, 2001). El DNA de las colonias positivas identificadas por ausencia de color se amplificó con *TempliPhi 100 Amplification Kit* (Amersham), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante, y se analizó mediante secuenciación (apartado 4.11).

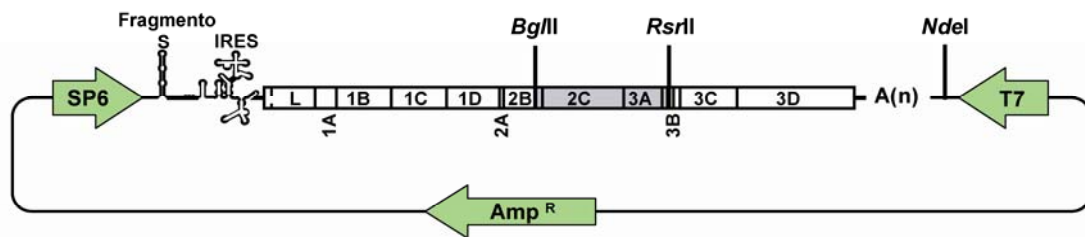
- Se empleó el vector pGEM-4Z (Promega) para clonar los productos de PCR de las regiones genómicas comprendidas entre los residuos 4027 y 6009 (que incluye parte de 2B, 2C, 3A y parte de 3B), y los residuos 6610 y 7992 (en 3D) del genoma del VFA. Estas dos regiones genómicas se amplificaron con los oligonucleótidos *2BR3* y *3CD1*, y *N-INFU-PET-3D* y *HindIII-3DMinus*, respectivamente (Tabla 4.1). Los productos finales de PCR purificados se digirieron con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoR1* en el caso de la amplificación de la región codificante 2B-3B, y *HindIII* y *XhoI* en el caso de la PCR de la región genómica 3D. El vector pGEM-4Z también fue digerido con las correspondientes enzimas de restricción utilizadas para cada DNA. El tratamiento de DNA con enzimas de restricción (New England Biolabs) se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor. En los casos en los que las dos enzimas utilizadas requiriesen un tampón distinto, el DNA se filtró a través de membranas de Microcon (Millipore) entre las digestiones. Previamente a la reacción de ligación, se purificaron los productos de digestión (apartado 4.10), y se eliminó el grupo 5' fosfato de los extremos del vector pGEM-4Z por tratamiento con fosfatasa alcalina (USB), seguido de inactivación de las enzimas por calor (incubación durante 20 minutos a 65°C). La reacción de ligación del producto de PCR con el vector se llevó a cabo empleando T4 DNA ligasa (New England Biolabs), en presencia del tampón suministrado por el fabricante. A continuación, se transformó en células competentes de *E. coli* DH5- α . Las colonias se aislaron en placas Petri con medio LB con ampicilina (100 μ g/ml, Sigma), IPTG (400 μ g/ml, Sigma) y X-gal (400 μ g/ml, Sigma), y se identificaron visualmente las positivas por ausencia de color (Sambrook & Russell,

2001). El DNA de las colonias se amplificó por PCR utilizando la DNA polimerasa *EHF* (apartado 4.9) y se analizó mediante secuenciación (apartado 4.11).

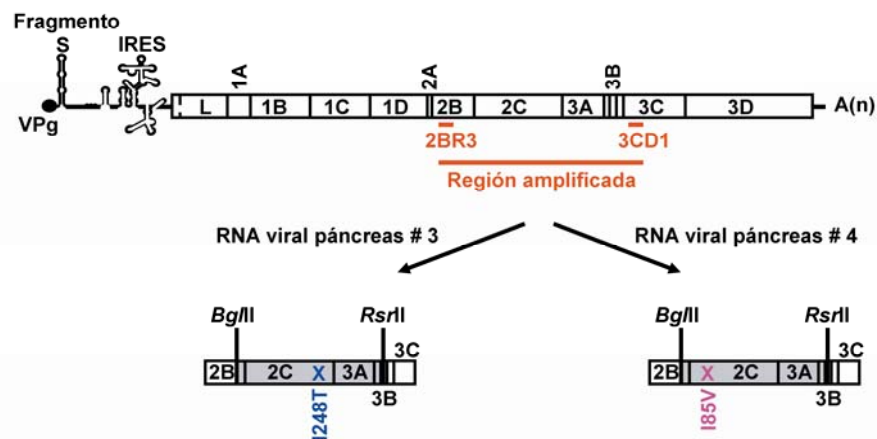
4.13.2- Construcción de transcritos infecciosos con mutaciones puntuales

Se construyeron transcritos infecciosos portadores de las mutaciones I85V ó I248T en la proteína 2C en el contexto de secuencia del VFA C-S8c1 (Figura 4.1). Para ello, se utilizó como vector el plásmido pMT28. Los insertos con las mutaciones deseadas se obtuvieron a partir del RNA de las poblaciones virales de páncreas de los ratones número 3 y 4 infectados con VFA C-S8c1 (apartado 5.1.4 de Resultados), que presentaban las mutaciones correspondientes a las sustituciones I248T e I85V en la proteína 2C, respectivamente. Se amplificó la región genómica comprendida entre los residuos 4027 y 6009 (que abarca parte de 2B, 2C, 3A y parte de 3B) del RNA del VFA por RT y PCR en dos pasos (apartado 4.9). Se emplearon los oligonucleótidos *2BR3* y *3CD1* (Tabla 4.1). La reacción de PCR se llevó a cabo con la DNA polimerasa *PfuUltra* (apartado 4.9). Los productos finales de PCR purificados (apartado 4.10) y el plásmido pMT28, se digirieron con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Rsr*II (New England Biolabs), siguiendo los consejos del proveedor y filtrando el DNA a través de membranas de Microcon (Millipore) entre las dos digestiones. Tras la digestión, los insertos se purificaron, y el plásmido pMT28 se defosfató por tratamiento con fosfatasa alcalina (USB). En los casos en los que las enzimas no pudieron ser inactivadas por calor (incubación durante 20 minutos a 65°C), el vector defosfatado también fue purificado. A continuación, se ligó el producto de PCR con el vector, empleando T4 DNA ligasa (New England Biolabs). El producto de la ligación se trasformó en células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico, y las colonias de bacterias se aislaron en placas Petri con medio LB con ampicilina (100 µg/ml, Sigma). Las bacterias de las colonias se cultivaron toda la noche en medio LB con ampicilina. Posteriormente, el DNA plasmídico se extrajo mediante el kit *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega) y se analizó por secuenciación (apartado 4.11).

A



B



C

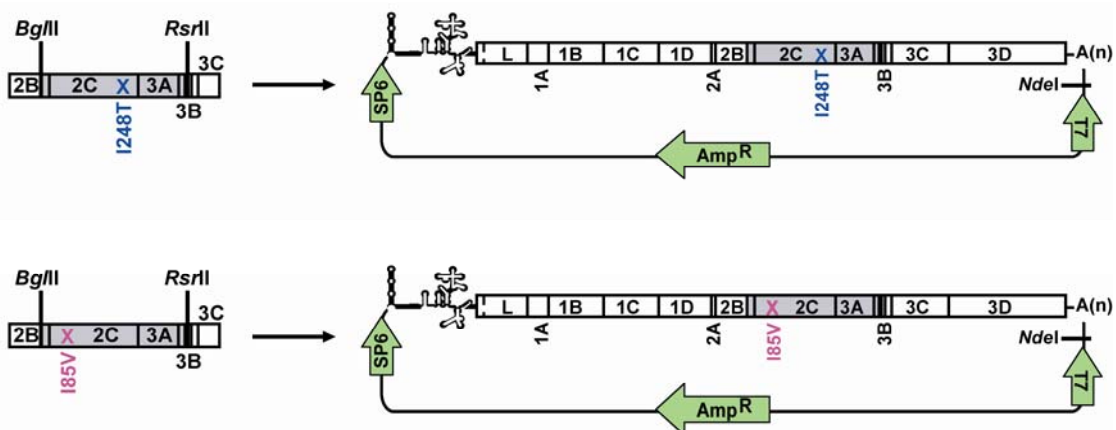


Figura 4.1. Representación esquemática de la construcción de los transcritos infecciosos C-S8c1 V-85 y C-S8c1 T-248. En la figura se muestra la estrategia de clonaje seguida para obtener los transcritos infecciosos con las mutaciones I85V ó I248T en 2C en el contexto de secuencia de C-S8c1. En la parte A, se representa el plásmido pMT28, que contiene la secuencia de C-S8c1, con 35 residuos de citidina en el poliC y 25 de adenosina en el poliA. Además, incluye promotores para las RNA polimerasas SP6 y T7, ubicados directamente al inicio o al final del genoma de C-S8c1, respectivamente, y un gen de resistencia a ampicilina (Amp^R); todos ellos se representan con flechas verdes.

Figura 4.1. (Continuación). Se resalta en gris el fragmento del genoma ubicado entre las dianas para las enzimas de restricción utilizadas (*Bgl*II y *Rsr*II, New England Biolabs). También se indica la diana de restricción para *Nde*I, empleada para linearizar el plásmido previamente a la transcripción por SP6 (apartado 4.14). En la parte B, se representa la localización de los oligonucleótidos y del fragmento genómico amplificado (en naranja) en el genoma del VFA C-S8c1. Las amplificaciones por RT y PCR del RNA viral del páncreas del ratón # 3 ó del RNA viral de páncreas del ratón # 4 (secuencias descritas en la Tabla 5.4 de Resultados), dieron lugar a los productos utilizados en los clonajes, con las mutaciones I248T (en azul) ó I85V (en rosa) en la proteína 2C, respectivamente. Se resalta en gris la región del producto amplificado entre las dianas de restricción utilizadas. En la parte C, se indica el plásmido resultante de la reacción de ligación entre cada uno de los productos amplificados y el plásmido pMT28, previamente digeridos con las enzimas *Bgl*II y *Rsr*II.

4.14- Transcripción de plásmidos

El DNA del plásmido pMT28 sin mutaciones y de los plásmidos pMT28 portadores de las mutaciones correspondientes a las sustituciones I85V ó I248T en la proteína 2C, se linearizó por digestión con *Nde*I (New England Biolabs) y se purificó (apartado 4.10). A continuación, se llevó a cabo la reacción de transcripción con 100-200ng del DNA digerido y purificado, 8,5 U de RNA polimerasa *SP6* (Promega), tampón de transcripción optimizado 1x (Promega), ditiotretitol (DTT) 10 mM, 0,5 mM de una mezcla equimolar de NTPs (ribonucleótidos), albúmina de suero bovino (BSA), y 20 U de RNAsina (Promega), en un volumen final de 20 µl, durante 2 horas de incubación a 37°C (Baranowski *et al.*, 1998). La concentración de RNA obtenida se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio por comparación con cantidades conocidas de RNA ribosómico.

4.15- Transfección de células BHK-21

4.15.1- Transfección con RNA transcrito de clones infecciosos

Se transfectaron monocapas de células BHK-21 subconfluentes (al 70% de confluencia) en placas M6 (alrededor de 4×10^5 células/pocillo) con el RNA de los transcritos infecciosos construidos (aproximadamente 10^{11} moléculas de RNA), y lipofectina (Gibco) (Sambrook & Russell, 2001). Los sobrenadantes de las

transfecciones se recogieron a las 72 horas post-transfección, cuando el efecto citopático (EC) afectaba al 95% de las células. A continuación, se crecieron los virus de cada sobrenadante mediante dos infecciones sucesivas en medio líquido de monocapas de células BHK-21 en placas *p60* con 200 μ l de sobrenadante. Estas dos infecciones se mantuvieron hasta observar ECC. Se extrajo el RNA del virus procedente de la segunda infección, y se amplificó y secuenció la región codificante 2C para comprobar la presencia de las mutaciones introducidas en los transcritos infecciosos.

4.15.2- Transfección con RNA extraído de poblaciones virales

Del mismo modo que en el caso de los transcritos infecciosos, se transfectaron monocapas de células BHK-21 subconfluentes (al 70% de confluencia) en placas *M6* con RNA viral y lipofectina (Gibco). En esta ocasión, las células se transfectaron con RNA (10^9 - 10^{11} moléculas) de las poblaciones virales de suero y páncreas obtenidas a las 24 hpi de los ratones número 8 y 10 inoculados con VFA C-S8c1 (el número de ratón corresponde al descrito en la Figura 5.2 de Resultados). Los virus del sobrenadante de la transfección se recogieron a tiempos tempranos (24-36 horas) post-transfección, cuando el EC afectaba al 20% de las células, y a tiempos tardíos (48-60 horas) post-transfección, cuando se observaba ECC. A tiempos tempranos post-transfección (cuando el EC afectaba al 20% de las células) también se recuperó el virus intracelular, tal y como se describe en el apartado 4.7. Los virus obtenidos de estas transfecciones no se pasaron en células BHK-21 antes de ser utilizados en estudios biológicos o moleculares.

4.16- Determinación de la frecuencia de mutación y la entropía de Shannon normalizada de poblaciones del VFA

La complejidad de los espectros de mutantes de poblaciones del VFA se determinó midiendo los siguientes parámetros derivados del análisis de secuencias (Domingo, 2007):

- La frecuencia de mutación mínima: es el número de mutaciones distintas encontradas en un conjunto de secuencias dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.

- La frecuencia de mutación máxima: es el número total de mutaciones encontradas (contando las mutaciones repetidas) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.
- La entropía de Shannon normalizada: es una medida de la similitud existente entre los genomas que constituyen un espectro de mutantes. Presenta valores entre 0 y 1, siendo 0 el valor que corresponde a una homogeneidad máxima (todas las moléculas analizadas son iguales entre sí) y 1 el valor de la heterogeneidad máxima (todas las moléculas estudiadas son distintas entre sí) (Volkenstein, 1994). La aplicación de este parámetro al estudio de las cuasiespecies virales se ha descrito previamente (Pawlotsky *et al.*, 1998; Airaksinen *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2007). La entropía de Shannon normalizada (S_n) se calcula a partir de la ecuación:

$$S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$$

En esta ecuación p_i , es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie, y N , es el número total de secuencias analizadas.

4.17- Análisis estructural de las mutaciones encontradas en las secuencias consenso y en los espectros de mutantes de las poblaciones virales estudiadas

El análisis estructural del RNA con las sustituciones de nucleótido encontradas en el fragmento S, *cre* e IRES de la región 5'UTR del genoma del VFA (apartado 2.6.2.1), se llevó a cabo mediante el empleo del programa *Mfold* (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>) (Zuker, 2003).

Para el análisis estructural de las proteínas de la cápsida VP3 y VP1, de la proteasa L y de la polimerasa (3D) del VFA se utilizaron las coordenadas atómicas depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB). Los residuos y contactos entre residuos se localizaron y analizaron en un ordenador PC mediante el programa *PyMol* (DeLano Scientific LLC).

4.18- Análisis estadístico

La aplicación del test t-Student para datos no pareados de dos colas y del análisis de la varianza (ANOVA) de un factor se realizaron mediante el procesador

estadístico Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU). Para el cálculo del test exacto de Fisher y del test χ^2 no se utilizaron procesadores estadísticos. En todos los casos se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

5. Resultados

5.- Resultados

5.1- Estudio de las propiedades del virus de la fiebre aftosa en infecciones en ratón

5.1.1- Determinación de la carga viral e infectividad específica del virus de la fiebre aftosa en páncreas de ratón

En nuestro laboratorio se ha investigado ampliamente la evolución de los virus RNA, utilizando como modelo el VFA, en cultivos celulares. Sin embargo nunca se ha llevado a cabo un análisis de la dinámica de las poblaciones del VFA en un sistema de mayor complejidad. Con el fin de abordar este análisis, se planteó como objetivo principal de esta tesis doctoral la caracterización de las propiedades del VFA en el modelo de ratón descrito en nuestro grupo (Salguero *et al.*, 2005) (detallado en el apartado 2.8 de Introducción).

En primer lugar, se estudió la cinética de replicación del virus a las 24 horas post-inoculación (hpi) mediante la determinación de la carga viral en páncreas, bazo, corazón y pulmón (Figura 5.1). Para ello, se inocularon cuatro ratones C57BL/6 hembras de 8-10 semanas de edad con 10^4 PFU de VFA C-S8c1 subcutáneamente en la almohadilla plantar (AP) (apartado 4.4.1). A las 24 hpi, los animales se perfundieron con PBS (apartado 4.4.3) para eliminar la sangre de los tejidos y evitar la contaminación por el virus de la sangre en la cuantificación y caracterización del virus presente en un tejido. En las necropsias se extrajeron el páncreas, el pulmón, el corazón y el bazo de cada animal. En cada uno de estos órganos se determinó el título viral mediante cuantificación de placas de lisis por plaqueo en BHK-21 (apartado 4.6.3.1). El páncreas fue el órgano en el que se observó mayor título viral, coincidiendo con resultados previos en el laboratorio (Salguero *et al.*, 2005).

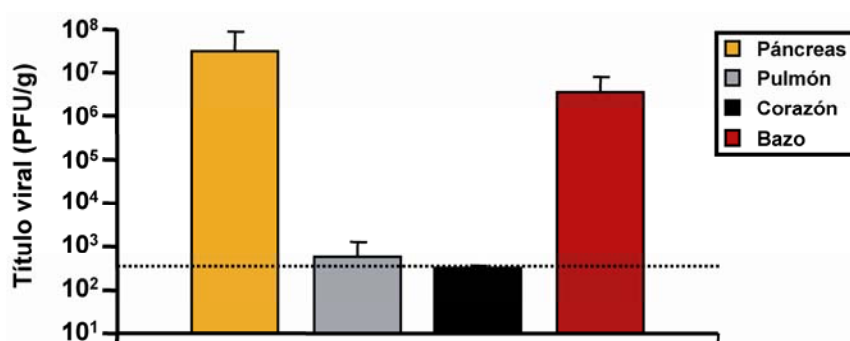


Figura 5.1. **Título viral en páncreas, pulmón, corazón y bazo de ratones inoculados con C-S8c1.** En la figura se muestran los valores medios y las desviaciones estándar del número de PFU por gramo de tejido de cuatro ratones inoculados. La línea de puntos indica el límite de detección (5×10^2 PFU/g de tejido).

Para analizar las propiedades de los virus aislados de páncreas, se inocularon cuatro ratones de 8-10 semanas de edad en la AP derecha con 10^4 PFU de VFA C-S8c1. A las 24 hpi se les extrajo una muestra de sangre para la obtención de suero (apartado 4.4.1) y detección de viremia y, posteriormente se les sacrificó con perfusión en PBS (ratones #1-4, Figura 5.2), y se determinaron la carga e infectividad viral en el páncreas. Se observó que entre ratones individuales la cantidad de PFU por gramo de páncreas determinado mediante ensayos de plaqueo en BHK-21, era variable, con diferencias de más de dos logaritmos, mientras que todos los ratones analizados presentaron valores elevados de viremia a las 24 hpi (más de 10^6 PFU por ml de suero) y poco variables (ratones #1-4, Tabla 5.1). Además, el número de moléculas de RNA viral en páncreas, cuantificado por RT-PCR a tiempo real (apartado 4.12), no variaba proporcionalmente al título viral en páncreas (ratones #1-4, Tabla 5.1). Esto indicaba que la infectividad específica, o número de partículas formadoras de placa por genoma viral, de los virus aislados de páncreas de ratones inoculados con C-S8c1 presentaban considerables diferencias. Para comprobar que estos valores de infectividad específica no estaban reflejando pérdida de infectividad o destrucción de partículas virales por activación de enzimas pancreáticas durante la extracción y manipulación de los tejidos previa congelación, se inocularon seis ratones con VFA C-S8c1. A las 24 hpi, se sacrificaron y perfundieron tres ratones con un cocktail de inhibidor de proteasas (apartado 4.4.3) (ratones #5-7, Tabla 5.1) y tres ratones con PBS (ratones #8-10, Tabla 5.1). La cantidad de virus en páncreas determinada por ensayos de plaques en células BHK-21 era tan

variable entre los ratones perfundidos con el cocktail de inhibidor de proteasas como entre los ratones perfundidos con PBS (ratones #5-10, Tabla 5.1).

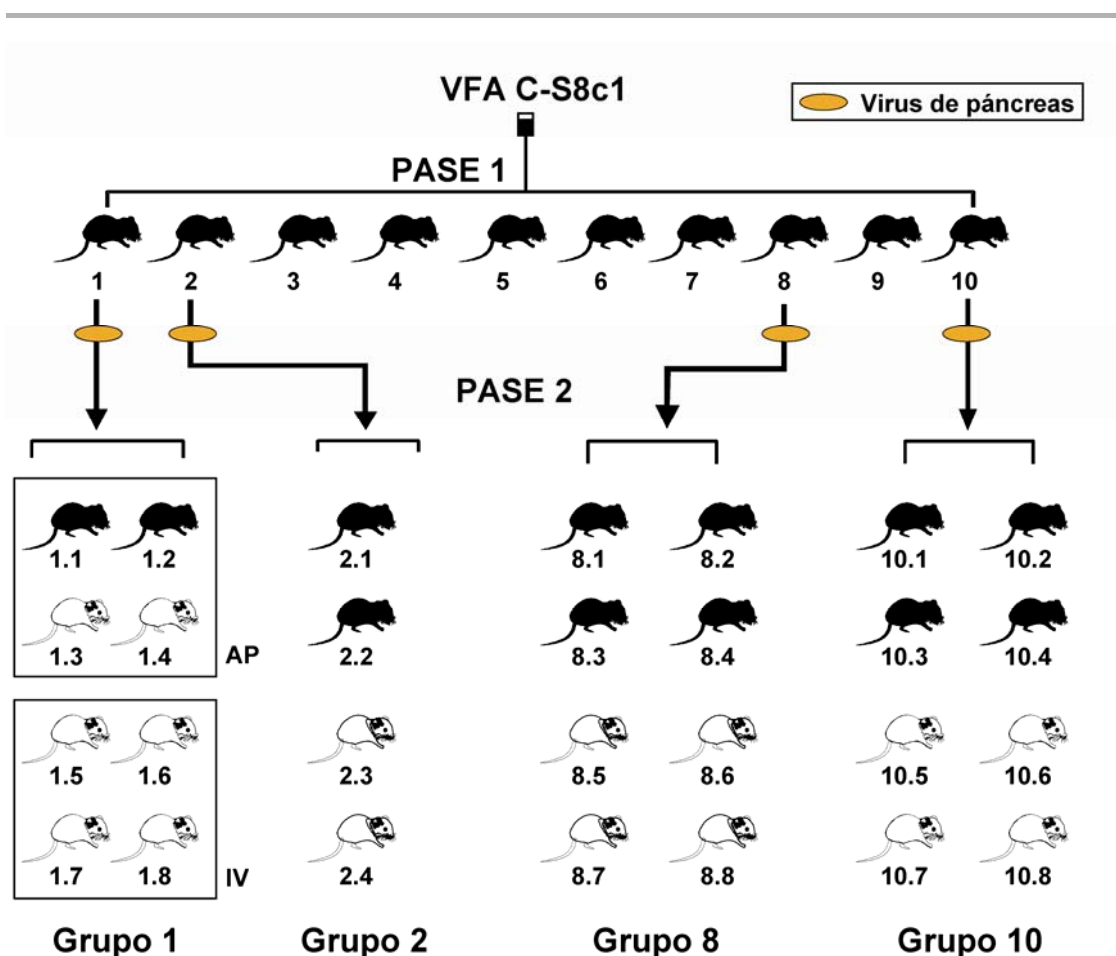


Figura 5.2. Diseño experimental de pases de VFA C-S8c1 en páncreas de ratón *in vivo*. Se inocularon diez ratones con 10^4 PFU de VFA C-S8c1 en la AP (pase 1). El virus recuperado de páncreas de los ratones 1, 2, 8 y 10 fue inoculado en ratones naíves (no infectados) (pase 2). Las inoculaciones con el virus de páncreas del ratón número 1 se hicieron de la siguiente manera: se inocularon cuatro ratones (1.1, 1.2, 1.3 y 1.4) con 10^3 PFU en la AP y cuatro ratones (1.5, 1.6, 1.7 y 1.8) con 10^4 PFU intravenoso (IV). Todos los demás ratones del pase 2 fueron inoculados en la AP con 10^4 PFU de los virus de páncreas de los ratones 2, 8 y 10. Los ratones inoculados se dividieron en los grupos 1, 2, 8 y 10. Se representa en negro, aquellos que se sacrificaron a las 24 hpi para extraer el páncreas y otros órganos (apartado 4.4.3); y en blanco, los animales que se mantuvieron con vida para la observación de síntomas clínicos.

Tabla 5.1. Título viral en suero y páncreas y número de moléculas de RNA viral e infectividad específica en páncreas de ratones inoculados con VFA C-S8c1

RATÓN	SUERO (24 hpi)	PÁNCREAS (24 hpi)		
	Título viral (PFU/ml)	Título viral (PFU/g)	RNA viral ^a	Infectividad específica ^b
1	$(4,2 \pm 1,1) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^6$	$(2,1 \pm 2,0) \times 10^{12}$	$(6,1 \pm 5,9) \times 10^{-7}$
2	ND ^c	$(5,8 \pm 2,4) \times 10^6$	$(5,7 \pm 7,2) \times 10^{14}$	$(1,0 \pm 1,3) \times 10^{-8}$
3	$(5,6 \pm 2,0) \times 10^7$	$(3,9 \pm 1,4) \times 10^3$	$(2,5 \pm 2,4) \times 10^{13}$	$(1,5 \pm 1,6) \times 10^{-10}$
4	$(6,1 \pm 2,7) \times 10^7$	$(3,5 \pm 0,7) \times 10^4$	$(1,4 \pm 1,2) \times 10^{13}$	$(2,6 \pm 2,3) \times 10^{-9}$
5	$(1,2 \pm 1,0) \times 10^8$	$<4,2 \times 10^{2e}$	$(5,6 \pm 5,1) \times 10^{13}$	$(<7,5 \pm 6,8) \times 10^{-12}$
6	ND ^c	$(5,5 \pm 2,1) \times 10^4$	$(2,5 \pm 1,7) \times 10^{12}$	$(2,2 \pm 1,7) \times 10^{-8}$
7	$(5,2 \pm 3,9) \times 10^8$	$(1,1 \pm 1,2) \times 10^7$	$(7,4 \pm 7,3) \times 10^{13}$	$(1,5 \pm 2,2) \times 10^{-7}$
8	$(4,3 \pm 3,9) \times 10^8$	$(2,5 \pm 1,6) \times 10^6$	$(2,4 \pm 2,2) \times 10^{14}$	$(1,0 \pm 1,2) \times 10^{-8}$
9	$(3,8 \pm 3,1) \times 10^8$	$(5,6 \pm 5,1) \times 10^4$	$(3,0 \pm 2,6) \times 10^{13}$	$(1,9 \pm 2,4) \times 10^{-9}$
10	$(3,1 \pm 0,6) \times 10^8$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^8$	$(5,1 \pm 6,6) \times 10^{14}$	$(2,5 \pm 3,3) \times 10^{-7}$
Control 1^f	ND ^d	$(1,1 \pm 0,7) \times 10^6$	$(1,8 \pm 1,6) \times 10^{11}$	$(6,3 \pm 7,0) \times 10^{-6}$
Control 2^f	ND ^d	$(1,4 \pm 1,0) \times 10^6$	$(3,4 \pm 2,9) \times 10^{11}$	$(4,1 \pm 4,6) \times 10^{-6}$
Control 3^f	ND ^d	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^6$	$(1,7 \pm 0,7) \times 10^{11}$	$(7,2 \pm 3,5) \times 10^{-6}$

Las determinaciones se hicieron por triplicado. Se representan entre paréntesis los valores medios y las desviaciones estándar.

^a RNA viral se expresa como el número de moléculas de RNA viral cuantificadas por RT-PCR a tiempo real por gramo de tejido (descrito en el apartado 4.12).

^b Infectividad específica es el número de PFU dividido entre el número de moléculas de RNA viral.

^c ND, no determinado. La severa deshidratación que presentaban estos ratones obligó a sacrificarlos sin una toma de sangre previa.

^d ND, no determinado.

^e No se detectaron PFUs en esta muestra.

^f Control #1 y #2 son páncreas de animales naïve, perfundidos con PBS o con el cocktail inhibidor de proteasas, respectivamente, mezclados con 1×10^6 PFU de VFA C-S8c1 y homogenizados del mismo modo que los páncreas de los ratones inoculados (descrito en el apartado 4.4.3). Control #3 es C-S8c1 procedente del sobrenadante de células BHK-21 infectadas. El título viral y el número de moléculas de RNA viral representado para dichos controles corresponden a valores absolutos, no relativizados a gramo de tejido.

Adicionalmente, y anticipándonos a que la homogenización (o cualquier otra alteración mecánica) del páncreas pudiera activar enzimas pancreáticas, se determinó la infectividad específica de VFA C-S8c1 mezclado con páncreas de ratones naïve (no infectados) (control #1 y #2, Tabla 5.1). Para ello, se mezcló una cantidad conocida de C-S8c1 (1×10^6 PFU) bien con el páncreas de un ratón perfundido con PBS (control #1) o bien con el páncreas de un ratón perfundido con el cocktail de inhibidor de proteasas (control #2) y se homogenizaron del mismo modo que los páncreas de los ratones inoculados. Las mezclas de C-S8c1 con los extractos de páncreas presentaron infectividades específicas similares a la de VFA C-S8c1 solo (control #3, Tabla 5.1). Todos estos datos sugieren que las enzimas pancreáticas no afectan a la infectividad específica de las poblaciones virales de páncreas de ratones infectados con VFA C-S8c1.

5.1.2- Análisis histopatológico de páncreas de ratones inoculados con el virus de la fiebre aftosa

Para determinar los daños en el tejido pancreático asociados a la replicación de VFA en páncreas, se inocularon en paralelo grupos de 8 ratones en la AP (50µl) bien con 10^4 PFU de C-S8c1 o bien con PBS y se evaluaron las consecuencias de la infección. A las 24 hpi, se sacrificaron los ratones inoculados bajo perfusión en PBS, y se extrajeron y analizaron los páncreas (Figura 5.3). La observación macroscópica durante la necropsia mostró páncreas aumentados de tamaño y edematosos. El estudio histológico reveló una reacción inflamatoria aguda (Figura 5.3B) con destrucción proteolítica del parénquima pancreático (Figura 5.3F) y hemorragia intersticial, afectando más severamente al tejido acinar que al páncreas endocrino. En general, el daño afectaba principalmente al páncreas exocrino, mientras que la mayor parte del tejido endocrino se vio poco afectado. Sin embargo, se observó inflamación leve en los islotes de Langerhans (Figura 5.3D) y una acusada infiltración de linfocitos tanto en el tejido endocrino como en el acinar. Estos datos indican que la infección por VFA C-S8c1 causa pancreatitis en ratón.

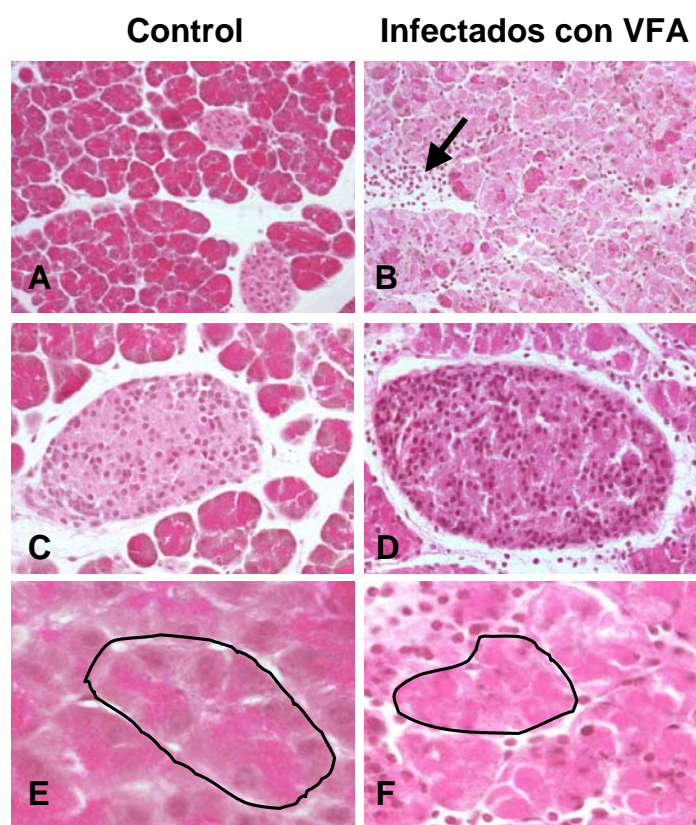


Figura 5.3. Análisis histopatológico del tejido pancreático de ratones control inoculados con PBS (A, C y E) o ratones inoculados con 10^4 PFU de VFA C-S8c1 (B, D y F). Se muestra un ejemplo representativo de los páncreas de los ratones utilizados en el análisis. Los páncreas fijados con formaldehído y embebidos en parafina, se cortaron en secciones de $4\text{ }\mu\text{m}$ de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (descrito en el apartado 4.5). Paneles A y B, páncreas exocrino y endocrino, respectivamente (aumento 100x). Se indica con una flecha la infiltración de linfocitos en los ratones infectados. Paneles C y D, los ratones infectados presentan una acusada infiltración de linfocitos en los islotes de Langerhans (aumento 200x). Paneles E y F, tejido exocrino (aumento 400x). Se produce pérdida de estructura acinar en los páncreas de los ratones infectados. Se encuadra en negro un único acino.

5.1.3- Pases del virus de la fiebre aftosa en páncreas de ratón *in vivo*

5.1.3.1- Virulencia en ratón de las poblaciones virales aisladas de páncreas

Con el objetivo de determinar las propiedades evolutivas de los virus de páncreas, se llevaron a cabo pases seriados del VFA en páncreas de ratón. Para ello, se inocularon ratones naïve con los virus de páncreas de los ratones número 1, 2, 8 y 10

(perfundidos con PBS), elegidos en función de su alto título viral, puesto que permitía la inoculación de dosis altas en nuevos ratones (pase 2, Figura 5.2). Las inoculaciones se realizaron de acuerdo con el siguiente diseño experimental: se inocularon ocho ratones con el virus de páncreas del ratón número 1 (grupo 1, Figura 5.2), cuatro con 10^3 PFU en la AP y cuatro con 10^4 PFU intravenoso (IV); cuatro ratones con 10^4 PFU en la AP del virus de páncreas del ratón número 2 (grupo 2, Figura 5.2); ocho ratones con 10^4 PFU en la AP del virus de páncreas del ratón número 8 (grupo 8, Figura 5.2); y ocho ratones con 10^4 PFU en la AP del virus de páncreas del ratón número 10 (grupo 10, Figura 5.2). La mitad de los ratones de cada grupo (seis de los ocho ratones inoculados, en el caso del grupo 1) fueron sometidos a seguimiento clínico durante 30 días (ratones blancos, Figura 5.2).

Adicionalmente, como control de que el virus produce una patogenia similar en ratón cuando se inocula en la AP ó IV, se inocularon ocho ratones con 10^4 PFU de C-S8c1: cuatro IV y cuatro en la AP, y se les sometió a seguimiento clínico y detección de viremia a las 4, 8 y 24 hpi. En los dos grupos de ratones, el porcentaje de supervivencia y la cinética de viremia fueron equivalentes, independientemente de la ruta de inoculación (Figura 5.4 A y B).

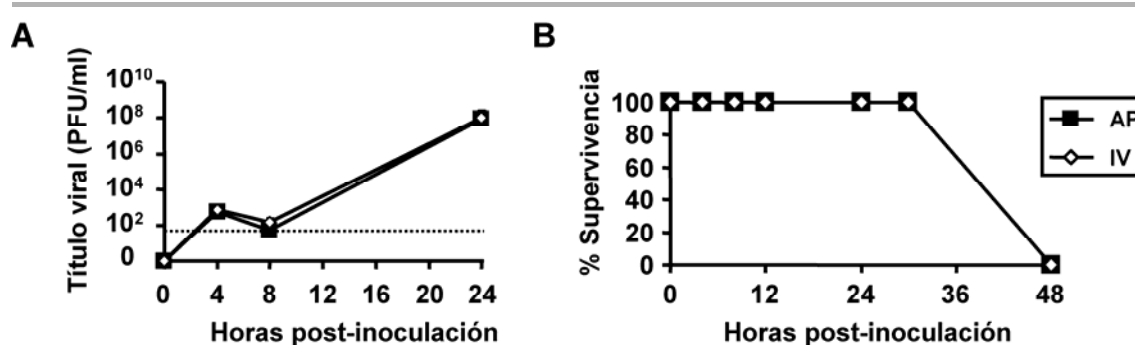


Figura 5.4. Cinética de replicación en sangre e índice de supervivencia de ratones inoculados con 10^4 PFU de VFA C-S8c1 en la AP o IV. En la parte A, se indica el número de PFU/ml de suero a las 0, 4, 8 y 24 hpi, determinado por ensayos de plaqueo en células BHK-21. Se representan los valores medios y las desviaciones estándar de las determinaciones de cuatro ratones. La línea de puntos indica el límite de detección (50 PFU/ml de suero). En la parte B, se muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados.

El índice de supervivencia de los ratones inoculados con 10^4 PFU del virus procedente de páncreas fue del 93% (se tienen en cuenta los ratones de los 4 grupos);

únicamente un ratón perteneciente al grupo 2 murió a los 7 días post-inoculación, el resto de los ratones inoculados sobrevivieron (Figura 5.5). También sobrevivieron los dos ratones pertenecientes al grupo 1 inoculados con 10^3 PFU del virus de páncreas (ratones 1.3 y 1.4, Figura 5.2). Además, los ratones supervivientes no mostraron síntomas clínicos de la enfermedad. Por el contrario, todos los ratones inoculados con 10^4 PFU de VFA C-S8c1 murieron entre las 36 y las 48 hpi (Figura 5.5), mostrando los síntomas descritos para esta enfermedad en ratones C57BL/6: deshidratación, apatía, postura encorvada, debilitamiento y ataxia (Salguero *et al.*, 2005).

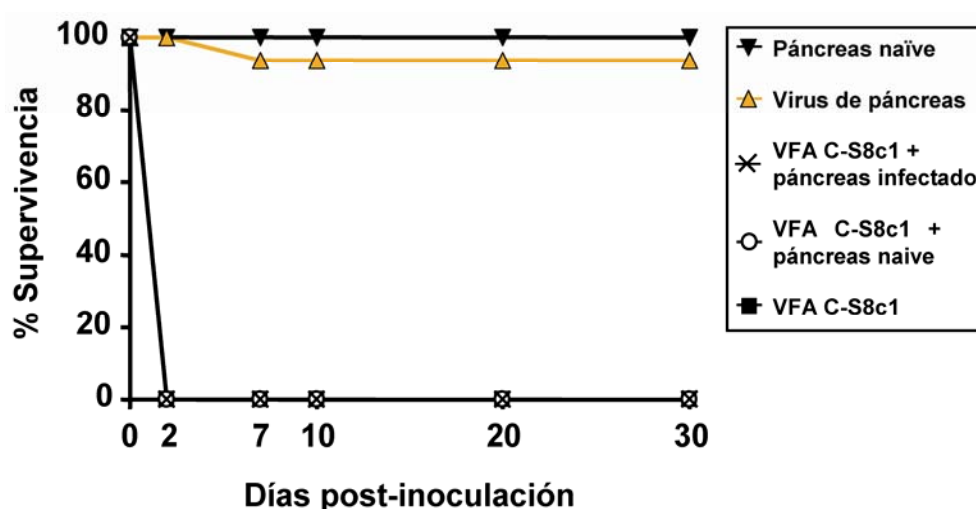


Figura 5.5. **Virulencia para ratón de los virus procedentes de páncreas de ratones infectados con VFA C-S8c1.** Se representa el porcentaje de supervivencia de ratones inoculados con 10^4 PFU de: VFA C-S8c1 (cuatro ratones), una mezcla de VFA C-S8c1 con páncreas naïve (cuatro ratones), una mezcla de VFA C-S8c1 con el páncreas infectado del ratón número 4 (cuatro ratones), virus de páncreas (14 ratones) o páncreas naïve (cuatro ratones) durante un periodo de seguimiento de 30 días. La reducida virulencia mostrada por los virus procedentes de páncreas a los 2 y 7 días post-infección con respecto a C-S8c1, C-S8c1 mezclado con páncreas naïve ó C-S8c1 mezclado con páncreas infectado es estadísticamente significativa (test exacto de Fisher, planteamiento bilateral $p=0,004$).

Para mimetizar las condiciones en las que se inocularon los virus de páncreas, se mezcló VFA C-S8c1 con el páncreas de un ratón naïve, se homogenizó del mismo modo que los páncreas infectados y se analizó la virulencia en ratón de 10^4 PFU del virus. En este contexto, VFA C-S8c1 mostró la misma virulencia que VFA C-S8c1 solo. Sin embargo, los ratones inoculados en la AP con 50 μ l de extracto de páncreas de

ratones naïve en PBS al mismo porcentaje de peso/volumen que en la mezcla con VFA C-S8c1 (apartado 4.4.3), sobrevivieron y no presentaron síntomas clínicos (Figura 5.5). Para descartar la posibilidad de que la replicación del VFA en páncreas pudiera desencadenar la producción de enzimas pancreáticas (u otras moléculas capaces de inactivar el virus), resultando en una disminución de la infectividad, se mezcló VFA C-S8c1 con el extracto de páncreas del ratón infectado número 4 (Tabla 5.1) (elegido debido a la baja infectividad específica que presentó el virus). Los ratones inoculados con 10^4 PFU de la mezcla de VFA C-S8c1 en el extracto de páncreas infectado, murieron entre las 36 y 48 hpi (Figura 5.5), indicando que el virus de páncreas no estaba siendo destruido por actividades antivirales o enzimas pancreáticas que hubieran podido activarse durante la infección viral. En conclusión, las poblaciones virales procedentes de páncreas presentaban un fenotipo atenuado en ratón.

5.1.3.2- *Replicación viral en ratón de los virus procedentes de páncreas*

Se estudió si la reducida virulencia mostrada por los virus de páncreas se correspondía con una menor replicación viral en ratón. Para ello, la mitad de los ratones de cada grupo de pase 2 (inoculados con virus procedente de páncreas) (dos de ocho, en el grupo 1) fueron sangrados para la detección de viremia y sacrificados con perfusión en PBS, a las 24 hpi (ratones negros, Figura 5.2). Se titularon las muestras de suero y páncreas mediante ensayos de plaqueo en células BHK-21. Once de los 12 ratones de pase 2 sacrificados mostraron viremia negativa (por debajo del límite de detección, 50 PFU/ml de suero). Únicamente el ratón 1.2 (Figura 5.2) presentó un título en suero de $3,4 \times 10^4$ PFU/ml. De un modo similar, la infectividad viral en páncreas fue negativa en los 12 ratones analizados (por debajo del límite de detección, 10^2 PFU/g de tejido) (Tabla 5.2). Para determinar si los extractos de páncreas del pase 2 contenían pequeñas cantidades de virus con capacidad de producir infecciones citolíticas en células BHK-21, se llevaron a cabo infecciones en medio líquido con los homogenizados de páncreas de los ratones 1.1 y 1.2 (Figura 5.2) (apartado 4.6.1). Tras 72 hpi, no se recuperó virus infeccioso.

Adicionalmente, se determinó el nivel de RNA viral por RT-PCR en los páncreas de los ratones de pase 2 (apartado 4.9). En cinco de los 12 ratones analizados se detectaron niveles mayores de 10^7 moléculas de RNA viral por gramo de páncreas

(Tabla 5.2). Estos datos sugieren que el virus había replicado en el páncreas de al menos cinco ratones, a pesar de que no se pudiera detectar virus infeccioso en células BHK-21.

Tabla 5.2. Detección de virus en suero y páncreas de ratones del pase 2

RATÓN ^a	SUERO (24 hpi)	PÁNCREAS (24 hpi)	
	Título viral (PFU/ml) ^b	Título viral (PFU/g) ^c	RNA viral ^d
1.1	-	-	-
1.2	3,4 ($\pm 1,6$) $\times 10^4$	-	+++
2.1	-	-	++
2.2	-	-	+
8.1	-	-	-
8.2	-	-	+
8.3	-	-	-
8.4	-	-	+
10.1	-	-	-
10.2	-	-	-
10.3	-	-	-
10.4	-	-	-

^a Los números de ratón corresponden a los representados en la Figura 5.2.

^b El título viral se expresa como el número de PFU por ml de suero; -, indica viremia indetectable (<50PFU/ml).

^c El título viral en páncreas se representa como el número de PFU por gramo de tejido; -, indica virus indetectable (<10² PFU/g de tejido).

^d La detección de RNA viral se llevó a cabo mediante la amplificación por RT-PCR de dos regiones genómicas diferentes (apartado 4.9). El símbolo -, indica <10⁷ moléculas de RNA viral por gramo de tejido, mientras que los símbolos +, ++ y +++ corresponden a 10⁷-10⁸, 10⁸-10⁹ y >10⁹ moléculas de RNA viral por gramo de tejido, respectivamente.

Se comprobó que la baja carga viral en páncreas de los ratones inoculados con virus procedente de páncreas no producía pancreatitis. Para ello, se inocularon grupos de cuatro ratones en la AP con 10⁴ PFU de virus procedente de páncreas del ratón número 8 ó 10 del pase 1, o con extracto de páncreas naïve, o con PBS. Durante la necropsia, a las 24 hpi, no se observaron diferencias de tamaño, estructura o color entre

los páncreas de ratones infectados y los de los ratones naïve. Además, en el análisis histopatológico no se detectaron lesiones graves en los páncreas de los ratones infectados: el tejido exocrino presentó únicamente leve inflamación de los acinos y el tejido endocrino no se vio afectado.

Tabla 5.3. Detección de virus en páncreas, pulmón, corazón y bazo de ratones del pase 2

Ratón ^a	Tejido ^b	PFU/g tejido (24 hpi) ^c	RNA viral (24 hpi) ^d
1.1	Páncreas	-	-
	Pulmón	-	++
	corazón	-	-
	Bazo	-	-
1.2	Páncreas	-	+++
	Pulmón	-	++
	corazón	-	++
	Bazo	-	+++
2.1	Páncreas	-	++
	Pulmón	-	++
	corazón	-	+
	Bazo	-	++
10.3	Páncreas	-	-
	Pulmón	-	-
	corazón	-	+
	Bazo	-	+

^a Los números de ratón corresponden a los representados en la Figura 5.2.

^b Se llevó a cabo la detección de virus y RNA viral en pulmón, corazón y bazo y se comparó con la observada en el páncreas de los mismos ratones.

^c El título viral se representa como el número de PFU por gramo de tejido; -, indica virus indetectable (<10² PFU/g de tejido).

^d Mismos símbolos que en Tabla 5.2, leyenda ^d.

Igualmente, se analizó si la replicación del virus procedente de páncreas causaba diabetes en los ratones inoculados. Para ello, se inocularon grupos de ratones en la AP con 10⁴ PFU de virus procedente de páncreas del pase 1 (ocho ratones) ó con extracto de páncreas de un ratón naïve (cuatro ratones), y se evaluó el metabolismo de la glucosa

de los dos grupos de ratones a los 7, 14 y 21 días post-inoculación. Se midieron los niveles de glucosa en sangre de los ratones en ayunas, antes y después de inocularles una disolución de glucosa por vía intraperitoneal (apartado 4.4.2). La concentración media de glucosa en sangre de los ratones no infectados fue de 8,0 (\pm 0,7) mmol de glucosa/L de sangre y 8,1 (\pm 0,0) mmol de glucosa/L de sangre antes y después de la inoculación de glucosa, respectivamente. Los ratones infectados presentaron 7,0 (\pm 0,5) mmol de glucosa/L de sangre antes del inóculo de glucosa y 8,0 (\pm 0,1) mmol/L después del inóculo. Además, se midió la concentración de glucosa en sangre de ratones no inoculados que no habían estado en ayunas. En estas condiciones, la concentración media de glucosa fue 7,3 (\pm 0,4) mmol/L. Los niveles de glucosa en sangre alcanzados tras el inóculo de glucosa fueron equivalentes en ratones infectados y no infectados, sugiriendo que los ratones infectados no tenían alterado el metabolismo de la glucosa. A partir de estos datos se concluye que, a pesar de que los virus de páncreas puedan causar daños leves en los páncreas de los ratones inoculados, la lesión producida no es suficiente para dar lugar a una disfunción asociada del páncreas.

Dado que en el pase 2 el virus inoculado procedía de páncreas de ratones infectados, la detección de RNA viral en páncreas podía estar indicando un tropismo preferencial del virus por replicar en páncreas. Para investigar esta posibilidad, se analizó la presencia de virus, mediante ensayos de plaqueo en BHK-21 y amplificación por RT-PCR, en otros órganos de ratones de pase 2. No se detectó virus infeccioso para células BHK-21 en los extractos de pulmón, corazón y bazo de los ratones 1.1, 1.2, 2.1 y 10.3 (Figura 5.2). Sin embargo, en la mayoría de las muestras se observó RNA viral por RT-PCR (Tabla 5.3). Estos datos indican que el virus replica en todos los tejidos analizados y no muestra tropismo preferencial por páncreas.

5.1.4- Determinación de cambios genéticos asociados a la replicación de VFA C-S8c1 en ratón

5.1.4.1- Sustituciones de nucleótido encontradas en las poblaciones virales de páncreas

Para identificar características genéticas que pudieran ser relevantes en la reducida patogenicidad en ratón del VFA procedente de páncreas, se determinó la

secuencia consenso del genoma completo de los virus aislados de páncreas de diez ratones del pase 1 (procedimientos descritos en los apartados 4.9, 4.10 y 4.11). En todas las secuencias consenso de las poblaciones virales analizadas se observaron sustituciones de nucleótido con respecto a la secuencia consenso del virus parental VFA C-S8c1 (Tabla 5.4).

Se valoraron posibles consecuencias de las sustituciones de nucleótido encontradas en distintas regiones genómicas del VFA (descritas en 2.6.2): fragmento S, *cre* e IRES, de la región 5'UTR del genoma, y de las mutaciones no sinónimas en los genes L, VP3 (ó 1C) y VP1 (ó 1D) de las poblaciones virales de páncreas en la estructura del RNA y, en el caso de mutaciones no sinónimas (Tabla 5.4), el posible efecto sobre las proteínas. La repercusión potencial de los cambios de aminoácido encontrados en las proteínas 2C y 3A no pudo ser analizada debido a la falta de una estructura tridimensional para dichas proteínas. Sin embargo, las sustituciones I85V e I248T en 2C, que aparecieron repetidas en distintos ratones (Tabla 5.4), no se localizan en la región de unión a nucleótido predicha para esta proteína (Dever *et al.*, 1987).

Se predijo la estructura del RNA termodinámicamente más estable de las subregiones genómicas del extremo 5'UTR con las mutaciones observadas, mediante el programa *Mfold* (apartado 4.17) (Zuker, 2003). El análisis del fragmento S sugiere que la mutación U150A genera un desapareamiento que da lugar a una remodelación local de la estructura y ello conlleva un aumento en la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG) de 1,2 Kcal/mol. En el *cre* (que presenta una estructura de tallo-bucle o “stem-loop”) aparecen dos mutaciones (C559U y U586C) en poblaciones virales diferentes. Ambas posiciones están localizadas en la zona de doble banda. La sustitución C559U ocasiona el cambio de un apareamiento G-C por G•U, menos estable, lo que supone un aumento de la ΔG de 2,4 Kcal/mol. La sustitución U586C provoca un desapareamiento, que conduce a un aumento de la ΔG de 0,9 Kcal/mol. Estos dos cambios predicen una disminución de la estabilidad de la estructura del *cre* y podrían favorecer que la estructura se abriera más fácilmente (ver Discusión, apartado 6.2). La posición 879 del IRES, donde se registra un cambio de nucleótido de U→C, se encuentra en la región genómica que conecta los dominios conservados 3 y 4 (apartado 2.6.2). Por lo tanto, este cambio no parece modificar la estructura del IRES.

Tabla 5.4. Cambios de nucleótido y aminoácido en las secuencias consenso de los virus de páncreas del pase 1 con respecto a C-S8c1

Ratón ^a	Sustitución de nucleótido ^b	Región genómica ^c	Sustitución de aminoácido ^d	Aceptabilidad, escala de Feng ^e	Conservación del residuo ^f
1	U879C	IRES	---	---	Variable
	U1358C	L	I107T	3	Conservado
	C2439U	1B	---	---	---
	C3333U	1D	---	---	---
2	U150A	Fragmento S	---	---	---
	C559U	<i>cre</i>	---	---	Conservado
	A1306G	L	T90A	5	Conservado
	G1410A	L	---	---	---
3	A4597G	2C	I85V	5	Conservado
	U5087U/C	2C	I248T	3	Variable
	U7197C/u	3D	---	---	---
4	U586U/C	<i>cre</i>	---	---	Variable
	A4597G/a	2C	I85V	5	Conservado
	C6570C/A	3C	---	---	---
5	A1052G	L	D5G	4	Variable
	U5087C	2C	I248T	3	Variable
	G5295A	2C	---	---	---
6	C3494U	1D	S96F	3	Variable
	A5537G	3A	H80R	4	Variable
7	A3075A/U	1C	E175D	5	Variable
	A4597A/G	2C	I85V	5	Conservado
	A5609A/G	3A	Q104R	3	Variable
8	U5087C	2C	I248T	3	Variable
	U6474C	3C	---	---	---
	U6702C	3D	---	---	---
9	A4597G	2C	I85V	5	Conservado
	C6096U	3C	---	---	---
10	C1746C/U	1A	---	---	---
	C3653A/c	1D	T149K	4	Variable

Se amplificaron y secuenciaron los genomas completos de los virus de páncreas extraídos a las 24 hpi de los 10 ratones del pase 1 (inoculados con 10^4 PFU de C-S81c1). Las dos mutaciones que aparecen repetidas en distintos animales se resaltan en azul o rosa.

^a Los números de ratón del 1 al 10 corresponden a los números de ratón de la Figura 5.2.

^b La primera letra corresponde al nucleótido encontrado en la secuencia de C-S8c1 y el número a la posición del residuo. La numeración de los residuos del genoma del VFA es la descrita en (Escarmis *et al.*, 1996). Dos letras mayúsculas separadas por una barra indican mezcla de ambos nucleótidos en una proporción equivalente. Una letra mayúscula separada de una letra minúscula por una barra indica una mezcla de nucleótidos con mayor proporción del escrito en mayúscula.

^c Se indica la región genómica en la que se encuentran las mutaciones. Las distintas zonas del genoma de VFA se detallan en la Introducción (apartado 2.6.2).

^d Los aminoácidos se representan utilizando el código de una letra (descrito en abreviaturas); el primer aminoácido es el que se encuentra en la secuencia de C-S8c1 y el número corresponde a la posición de dicho aminoácido dentro de cada proteína; ---, indica una mutación sinónima.

^e Aceptabilidad del cambio de aminoácido basado en el parecido estructural de los residuos y la interconvertibilidad genética. Escala del 1 al 5, siendo el 5 el valor de máxima aceptabilidad para un cambio (Feng *et al.*, 1984).

^f Se representa si el aminoácido sustituido está conservado en otros aislados de VFA. En las regiones no codificantes dicha conservación es relativa al nucleótido sustituido (Carrillo *et al.*, 2005). ---, indica una mutación sinónima en una región codificante.

A nivel de proteína, las sustituciones I107T y T90A en Lb (presentes en virus de páncreas de ratones 1 y 2, respectivamente, Tabla 5.4) se encuentran formando parte de dos bucles externos diferentes. Los residuos I107 y T90 interaccionan entre sí (la distancia mínima entre las cadenas laterales es de 2,50 Å) en la estructura tridimensional, lo que sugiere que estas sustituciones podrían estar implicadas en la adaptación a ratón (Guarne *et al.*, 1998; Cencic *et al.*, 2007). Además, no son cambios de aminoácidos drásticos según la escala de Feng: la sustitución I→T es de aceptabilidad media (grado 3, Tabla 5.4) y la T→A de máxima aceptabilidad (grado 5, Tabla 5.4).

Los aminoácidos 96 y 149 de la proteína VP1, y 175 de la proteína VP3 son residuos expuestos de la superficie de la cápsida (Lea *et al.*, 1994). La posición 149 de VP1 es parte del sitio antigénico A del bucle GH, y el aminoácido 175 de VP3 se localiza al lado del residuo 176 que forma parte del sitio antigénico 4 (Mateu *et al.*, 1994; Baranowski *et al.*, 2001). Además, los cambios S96F y T149K en la proteína VP1, y E175D en VP3 presentan valores de aceptabilidad de 3, 4 y 5, respectivamente, según la escala de Feng (Tabla 5.4). Por su localización, estas sustituciones en la cápsida no parecen tener importantes repercusiones a nivel estructural.

El análisis realizado sugiere que las poblaciones virales de páncreas estudiadas muestran estructuras del fragmento S, *cre* e IRES, y de las proteínas L, VP3 y VP1 compatibles con el mantenimiento de su función biológica.

En un análisis cuantitativo de las mutaciones halladas en las poblaciones virales procedentes de páncreas se observó que la mayor parte de las sustituciones de nucleótido se encontraron distribuidas en las regiones genómicas que codifican las proteínas no estructurales del virus: 19 de 29 sustituciones de nucleótido (Tablas 5.4 y 5.5). La diferencia entre el número de mutaciones por población viral en la región genómica no codificante, en las regiones genómicas que codifican las proteínas estructurales y en las regiones genómicas que codifican las proteínas no estructurales

del virus es estadísticamente significativa (ANOVA de un factor, $p < 0,001$). De las 19 mutaciones observadas en la región no estructural, 12 causan cambio de aminoácido y se localizan en su totalidad en las regiones genómicas que codifican las proteínas L, 2C y 3A (Tabla 5.4). Los cambios más llamativos del análisis de las secuencias consenso de los virus de páncreas son I85V e I248T en la proteína 2C, ya que se encontraron de forma repetida en distintos ratones: I85V en cuatro ratones e I248T en tres ratones (Tabla 5.4). Sin embargo, estas dos mutaciones nunca aparecieron juntas en ninguna de las secuencias consenso analizadas. La alta proporción de mutaciones coincidentes en la proteína 2C sugiere un papel para esta proteína en la replicación de VFA en ratón.

Tabla 5.5. Análisis de los tipos y frecuencias de mutación en las secuencias consenso de los virus de páncreas de los 10 ratones del pase 1

Región genómica ^a	Nº mutaciones ^b	Tipo de mutación ^c				Frecuencia de mutación ^d	
		Ts	Tv	NS	S	Mínima	Máxima
No codificante	4	3	1	---	---	$3,8 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-4}$
Proteínas estructurales	6	4	2	3	3	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$
Proteínas no estructurales	19	18	1	12	7	$2,9 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$
Total	29	25	4	15	10	$3,0 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$

^a No codificante, regiones genómicas que comprenden el 5' y 3' UTR. Proteínas estructurales, regiones genómicas que codifican las proteínas de la cápsida. Proteínas no estructurales, regiones genómicas que codifican las proteínas que no conforman la cápsida. Total, incluye los genomas completos de las 10 poblaciones virales de páncreas.

^b Número de sustituciones de nucleótido. Todas las sustituciones se tienen en cuenta en los cálculos, aunque aparezcan más de una vez.

^c Las mutaciones encontradas se clasifican en transiciones (Ts), transversiones (Tv), no sinónimas (NS), sinónimas (S).

^d La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones diferentes (no repetidas) dividido por el número total de nucleótidos secuenciados. La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.

5.1.4.2- *Sustituciones de nucleótido en las poblaciones virales de pulmón, corazón y bazo*

Con el propósito de evaluar si las mutaciones en la región genómica del *cre*, L, 2C y 3A se asocian a la replicación de VFA C-S8c1 en páncreas o, por el contrario, son mutaciones que se seleccionan durante la replicación del virus en ratón, independientemente de un órgano en particular, se analizaron las secuencias consenso de diferentes órganos de ratones inoculados con VFA C-S8c1. Se examinó la secuencia consenso de las regiones genómicas pseudonudos, *cre*, IRES, L, 2C y 3A de los virus procedentes de pulmón, corazón y bazo de los ratones número 1, 2, 8 y 10 del pase 1 (procedimientos descritos en los apartados 4.9, 4.10 y 4.11). Las mutaciones encontradas en estas regiones genómicas en las poblaciones virales de páncreas también se hallaron en la secuencia consenso de las poblaciones virales de pulmón, corazón y bazo del animal correspondiente, en la mayor parte de los casos (Tabla 5.6), por lo que las mutaciones no parecen específicas de la replicación en páncreas.

En la población viral de bazo del ratón número 1 apareció una nueva mutación en la región del IRES: A641G. Esta sustitución se localiza en un bucle del dominio conservado 2 (apartado 2.6.2) y no provoca cambios en su estructura según la predicción realizada con el programa *Mfold* (apartado 4.17) (Zuker, 2003). Del mismo modo, la sustitución D184N en la proteasa L de las poblaciones virales de corazón, pulmón y bazo del ratón número 2 no aparece en la población viral de páncreas del mismo ratón. La localización del residuo 184 en la estructura cristalina de la proteína Lb (Cencic *et al.*, 2007), mediante el programa *PyMol*, muestra que se encuentra en un bucle externo, al igual que las dos sustituciones (I107T y T90A) descritas en el apartado 5.1.4.1. Estos datos sugieren que las mutaciones observadas en las regiones genómicas *cre*, IRES, L, 2C y 3A surgen durante la replicación en ratón, no siendo exclusivas de la adaptación a páncreas. Igualmente, las sustituciones I85V e I248T en la proteína 2C se encontraron en las poblaciones virales de todos los órganos analizados de un mismo ratón (Tabla 5.6). Este dato refuerza la hipótesis de que las mutaciones encontradas en la proteína 2C juegan un papel importante en la adaptación de VFA a ratón.

Tabla 5.6. Sustituciones encontradas en la secuencia consenso de las poblaciones del VFA recuperadas de páncreas, pulmón, corazón y bazo de ratones del pase 1

Ratón ^a	Órgano ^b	Sustitución de nucleótido ^c	Región genómica ^d	Sustitución de aminoácido ^e	Aceptabilidad, escala de Feng ^f	Conservación del residuo ^g
1	Páncreas	U879C	IRES	---	---	Variable
	Pulmón	U5480C	3A	I61T	3	Variable
	Bazo	A641A/g U5480U/C	IRES 3A	---	---	Variable
2	Páncreas	U150A	Fragmento S	---	---	---
		C559U	<i>cre</i>	---	---	Conservado
		A1306G	L	T90A	5	Conservado
		G1410A	L	---	---	---
		A4597G	2C	I85V	5	Conservado
	Pulmón	C559C/U	<i>cre</i>	---	---	Conservado
		A1306A/G	L	T90A	5	Conservado
		G1410G/A	L	---	---	---
		G1588G/A	L	D184N	5	Conservado
		A4597A/G	2C	I85V	5	Conservado
	Corazón	C559C/U	<i>cre</i>	---	---	Conservado
		A1306A/G	L	T90A	5	Conservado
		G1410G/A	L	---	---	---
		G1588G/A	L	D184N	5	Conservado
		A4597A/G	2C	I85V	5	Conservado
	Bazo	C559C/U	<i>cre</i>	---	---	Conservado
		A1306A/G	L	T90A	5	Conservado
		G1410G/A	L	---	---	---
		G1588G/A	L	D184N	5	Conservado
		A4597A/G	2C	I85V	5	Conservado
8	Páncreas	U5087C	2C	I248T	3	Variable
	Pulmón	U5087C	2C	I248T	3	Variable
	Corazón	U5087C	2C	I248T	3	Variable
	Bazo	U5087C	2C	I248T	3	Variable
10	Páncreas	---	---	---	---	---
	Pulmón	---	---	---	---	---
	Corazón	---	---	---	---	---
	Bazo	---	---	---	---	---

Se analizaron las secuencias consenso de las regiones genómicas *cre*, IRES, L, 2C y 3A de las poblaciones de VFA procedentes de pulmón, corazón y bazo de los ratones del pase 1 y se compararon con las obtenidas para los virus de páncreas de los mismos ratones. Se analizaron los residuos 389-1641 y 4345-5757 en todos los ratones excepto en los virus procedentes de pulmón y bazo del ratón número 1, en los que sólo fue posible amplificar por RT-PCR los residuos 389-1095 y 4345-5757. La numeración de residuos del genoma del VFA corresponde a la descrita en (Escarmis *et al.*, 1996). Las dos mutaciones que aparecen repetidas en distintos animales se resaltan en azul o rosa.

^a Los números de ratón 1, 2, 8 y 10 corresponden a los números de ratón mostrados en la Figura 5.2.

^b Órganos de los se amplificó y secuenció el RNA viral.

^c Mismos símbolos que en Tabla 5.4, leyenda ^b.

^d Mismos símbolos que en Tabla 5.4, leyenda ^c.

^e Mismos símbolos que en Tabla 5.4, leyenda ^d.

^f Mismos símbolos que en Tabla 5.4, leyenda ^e.

^g Mismos símbolos que en Tabla 5.4, leyenda ^f.

5.1.4.3- Relación entre las sustituciones I85V ó I248T en la proteína 2C y la virulencia del VFA en ratón

Para estudiar la posible relación entre las sustituciones I85V ó I248T en la proteína 2C y la virulencia de VFA para ratón, se construyeron dos transcritos infecciosos de VFA C-S8c1 a partir del plásmido pMT28 (apartado 4.13.2): C-S8c1 V-85 (con la sustitución I85V en 2C) y C-S8c1 T-248 (con la sustitución I248T en 2C). Los virus infecciosos obtenidos tras dos pases seriados en células BHK-21 de los sobrenadantes de las células BHK-21 transfectadas con cada uno de los transcritos infecciosos construidos, mantenían las mutaciones introducidas. Se estudiaron las propiedades fenotípicas de los virus resultantes en cultivo de células e *in vivo*. La producción de progenie infecciosa en células BHK-21 de los dos clones infecciosos generados (C-S8c1 V-85 y C-S8c1 T-248) fue similar a la del clon infeccioso parental C-S8c1 pMT28. Asimismo, se ensayó la virulencia *in vivo* de cada uno de los clones infecciosos construidos mediante la inoculación de ratones C57BL/6 con 10^4 PFU en la AP. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de ratones a las 48 hpi entre C-S8c1 V-85 y C-S8c1 T-248, ó entre C-S8c1 V-85 y C-S8c1 pMT28 (test exacto de Fisher, $p < 0,05$) (Tabla 5.7 y Figura 5.6). Además, los animales inoculados con los mutantes C-S8c1 V-85 ó C-S8c1 T-248 presentaron síntomas clínicos similares a los observados en la infección con C-S8c1. Este resultado excluye la asociación entre las mutaciones puntuales en 2C y el fenotipo atenuado mostrado por los virus de páncreas de ratones inoculados con C-S8c1.

Adicionalmente, con el propósito de analizar la estabilidad en ratón de cada una de estas dos mutaciones en 2C, los ratones inoculados con los mutantes fueron sangrados a las 24 hpi para la determinación de las secuencias consenso de los virus de suero. A excepción del único ratón superviviente que mostró RNA viral en suero indetectable a las 24 hpi (por debajo de 10^4 moléculas de RNA viral/ μ l), las poblaciones

virales en suero de todos los ratones inoculados mostraron la mutación introducida en 2C (I85V ó I248T) (Tabla 5.7). Estos resultados indican que I85V ó I248T en 2C son estables en infecciones de VFA en ratón.

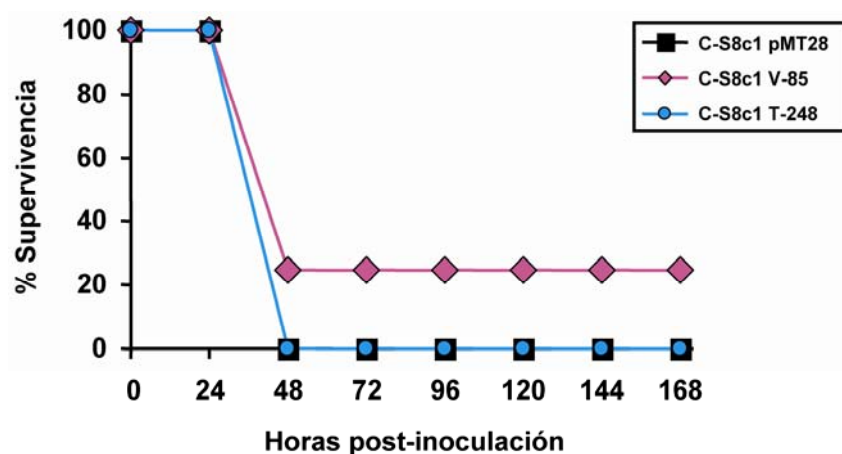


Figura 5.6. Virulencia en ratón de los clones infecciosos mutantes C-S8c1 V-85 y C-S8c1 T-248 con respecto al clon infeccioso parental C-S8c1 pMT28. En la figura se muestra el porcentaje de supervivencia de los tres grupos de cuatro ratones inoculados con 10^4 PFU de cada uno de los virus, durante un periodo de seguimiento de siete días.

Tabla 5.7. Propiedades fenotípicas de los virus infecciosos recuperados de los transcritos de VFA C-S8c1 V-85, C-S8c1 T-248 y C-S8c1 pMT28

VFA	Título viral ^a (PFU/ml)	Virulencia en ratón (% supervivencia ^b)	Presencia en suero de la mutación introducida ^c
C-S8c1 V-85	$(1.5 \pm 0,04) \times 10^7$	25 (1/4)	Sí ^d
C-S8c1 T-248	$(1.6 \pm 0,2) \times 10^7$	0 (0/4)	Sí
C-S8c1 pMT28	$(2.3 \pm 0,4) \times 10^7$	0 (0/4)	---

^a Título viral de los virus obtenidos tras dos pases seriados en células BHK-21 del sobrenadante de la transfección en células BHK-21 de los clones infecciosos transcritos.

^b Se expresa la virulencia en ratón como el porcentaje de ratones supervivientes a las 48 hpi. Entre paréntesis se indica el número de ratones vivos entre el número total de ratones inoculados.

^c Se analiza la presencia de la mutación introducida en los clones infecciosos, en los virus de suero de los ratones inoculados a las 24 hpi.

^d Uno de los cuatro ratones inoculados con C-S8c1 V-85 presentó RNA viral indetectable en suero ($<10^4$ moléculas de RNA/ μ l) a las 24 hpi; los otros tres mostraron la sustitución V85.

5.1.5- Virulencia en ratón de virus procedentes de bazo y suero

Resultaba de máximo interés investigar si distintas poblaciones virales procedentes de un mismo ratón inoculado con VFA C-S8c1 mostraban, al igual que las poblaciones virales de páncreas, un fenotipo atenuado en ratón. Para ello, se analizó la capacidad de propagarse, causar enfermedad y matar a ratones, de virus de suero y de bazo recuperados a las 24 hpi del ratón número 8 inoculado con VFA C-S8c1 (Figura 5.2) y se comparó con la virulencia manifestada por el virus de páncreas del mismo ratón (Figura 5.7).

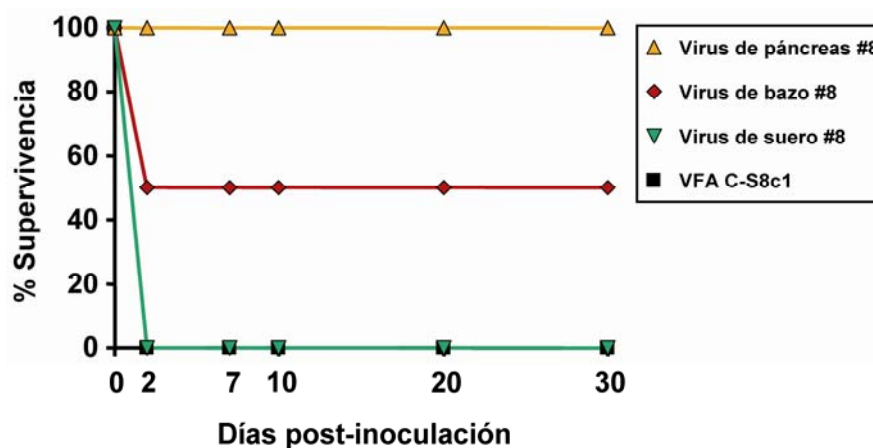


Figura 5.7. Virulencia en ratón de las poblaciones virales de páncreas, suero y bazo del ratón número 8 del pase 1 con respecto a la del virus parental VFA C-S8c1. Se inocularon grupos de cuatro ratones en la AP con 10^4 PFU de cada uno de los virus. Se representa el porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados durante un periodo de seguimiento de 30 días.

Los ratones inoculados con 10^4 PFU del virus aislado de suero mostraron síntomas similares a los ratones inoculados con 10^4 PFU del virus parental C-S8c1 y murieron todos entre las 36 y 48 hpi. Sin embargo, el 100% de los ratones inoculados con 10^4 PFU del virus de páncreas sobrevivieron y no mostraron síntomas de la enfermedad. Por otro lado, el virus procedente de bazo presentó una virulencia intermedia entre las poblaciones virales de páncreas y suero, matando al 50% de los ratones entre las 36 y 48 hpi con la misma dosis viral (Figura 5.7). Las diferencias en la supervivencia de ratones inoculados, a las 48 hpi, fueron estadísticamente significativas

únicamente entre los virus de suero y páncreas (test exacto de Fisher, planteamiento bilateral $p=0,02$).

Para profundizar en la caracterización de estas poblaciones virales, se determinó la infectividad específica de cada una de ellas. Los tres virus presentaron diferencias en sus infectividades específicas en células BHK-21, siendo la del virus de páncreas la más baja (Tabla 5.8). Dado que los valores de infectividad específica de los virus procedentes de órganos son más bajos que los de los virus de suero, la baja infectividad específica podría estar asociada con la atenuación de VFA en ratón. No obstante, esta posibilidad aún debe ser estudiada en profundidad, puesto que C-S8c1, incluso cuando se somete a pases en células BHK-21, puede variar su infectividad específica en órdenes de magnitud (Escarmis *et al.*, 2008) (Rubén Agudo, datos no publicados) (ver Discusión, apartado 6.1).

Tabla 5.8. Infectividad específica de C-S8c1 y de las poblaciones virales de páncreas, suero y bazo del ratón número 8 del pase 1

Población viral	Infectividad específica ^a (PFU/moléculas RNA viral)
C-S8c1	$(7,2 \pm 3,5) \times 10^{-6}$
Páncreas	$(1,0 \pm 1,2) \times 10^{-8}$
Suero	$(2,1 \pm 2,2) \times 10^{-4}$
Bazo	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-5}$

^a La infectividad específica se expresa como el número de PFU producido en células BHK-21 dividido entre el número de moléculas de RNA viral. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Se representan entre paréntesis los valores medios y las desviaciones estándar.

Con el objeto de estudiar el origen de las diferencias en virulencia de los virus de suero, bazo y páncreas del ratón número ocho infectado con C-S8c1, se analizaron las secuencias consenso del genoma completo de los virus de bazo y suero, y se compararon con la secuencia consenso de los virus de páncreas previamente analizada. No se observaron diferencias entre las secuencias consenso de las tres poblaciones virales (Figura 5.8). Estos resultados indican que virus aislados de distintos tejidos de

un mismo ratón, a pesar de no manifestar variaciones entre sus secuencias consenso, muestran considerables diferencias fenotípicas *in vivo*.

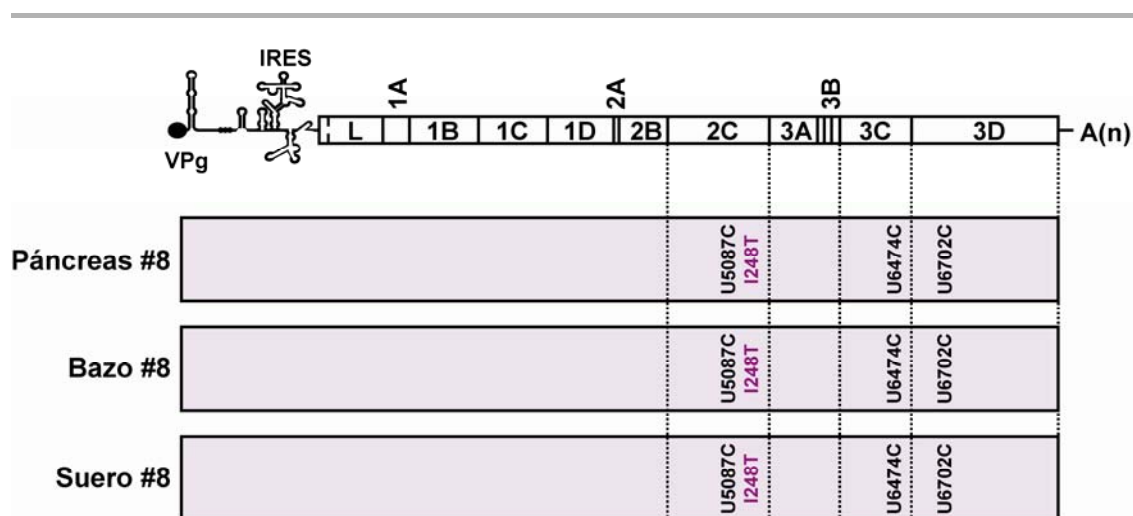


Figura 5.8. Esquema de la secuencia consenso del genoma completo de los virus de páncreas, bazo y suero del ratón número 8 del pase 1. Los rectángulos morados representan la secuencia del genoma completo de las poblaciones virales. Se indican los cambios de nucleótido observados (en negro) y los correspondientes cambios de aminoácido (en violeta) con respecto a la secuencia del virus parental C-S8c1. La primera letra corresponde al nucleótido o aminoácido encontrado en la secuencia de C-S8c1 y el número a la posición del residuo. Los aminoácidos se representan utilizando el código de una letra (descrito en abreviaturas).

5.1.6- Diversidad genómica de las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas

Recientemente, en trabajos realizados con el virus de la poliomielitis, se demostró que una disminución en la diversidad genética de la cuasiespecie compromete la adaptabilidad del virus a ratones susceptibles y conduce al virus a la pérdida de virulencia en ratón (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005; Vignuzzi *et al.*, 2006). Por ello, resultó de importancia investigar si en nuestro modelo, una diferencia en la complejidad de la cuasiespecie de las poblaciones virales aisladas de suero, bazo y páncreas del ratón número ocho (Figura 5.2) podía explicar las marcadas diferencias en virulencia en ratón manifestadas por estos virus. Con este propósito se compararon las frecuencias de mutación del espectro de mutantes de las tres poblaciones virales (Tabla 5.9). Se secuenciaron las regiones genómicas que codifican las proteínas VP1 y 2C, y parte de la región genómica que codifica las proteínas 2B y 3A, de un total de 74 ó 75 clones

moleculares (aproximadamente 80.000 nucleótidos) de cada población viral (procedimiento descrito en el apartado 4.13.1). En el análisis no se observaron diferencias significativas en el número de mutaciones diferentes por clon, ni en el número total de mutaciones por clon, entre los espectros de mutantes de las tres poblaciones virales (ANOVA de un factor, $p < 0.05$). La entropía de Shannon normalizada (apartado 4.16), que es una medida de la proporción de genomas distintos en una cuasiespecie, también fue similar para todas estas poblaciones virales (Tabla 5.9). Estos datos indican que no hay diferencias detectables mediante análisis clonal en la complejidad del espectro de mutantes de las tres poblaciones virales para las regiones genómicas estudiadas.

Tabla 5.9. Complejidad del espectro de mutantes de las poblaciones de VFA de páncreas, suero y bazo del ratón número 8 del pase 1, determinada por clonaje molecular

Población viral	Número de clones analizados	Sustituciones/nucleótidos secuenciados (frecuencia de mutación mínima) ^a	Sustituciones/nucleótidos secuenciados (frecuencia de mutación máxima) ^b	S_n^c	NS/S ^d
Páncreas	75	14/80.602 ($1,7 \times 10^{-4}$)	16/80.602 ($1,9 \times 10^{-4}$)	0.172	10/4=2,5
Suero	74	15/79.188 ($1,9 \times 10^{-4}$)	15/79.188 ($1,9 \times 10^{-4}$)	0.224	10/5=2,0
Bazo	75	24/80.602 ($3,0 \times 10^{-4}$)	24/80.602 ($3,0 \times 10^{-4}$)	0.259	19/5=3,8

^a La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones diferentes dividido por el número total de nucleótidos secuenciados (residuos 3208-3834 y 4072-5366) [la numeración de residuos del genoma del VFA corresponde al descrito en (Escarmis *et al.*, 1996)].

^b La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones dividido por el número total de nucleótidos secuenciados (residuos 3208-3834 y 4072-5366).

^c S_n , indica entropía de Shannon normalizada, que es una medida de la proporción de secuencias distintas en una distribución. Se calcula como $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, donde p_i es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y N es el número de genomas comparados (apartado 4.16) (Volkenstein, 1994).

^d NS/S es la relación entre mutaciones no sinónimas (NS) y sinónimas (S).

Para determinar si otras regiones genómicas presentaban una acumulación de mutaciones que pudiera explicar las diferencias fenotípicas virales observadas, se secuenció el genoma completo de cinco clones biológicos del virus procedente de

páncreas y de cinco clones biológicos del virus aislado de suero. En los clones de páncreas se encontraron 3 mutaciones, localizadas en las regiones genómicas que codifican las proteínas VP3, 2C y 3D, y en los clones de suero se observaron 4 mutaciones, situadas en las regiones genómicas fragmento S, IRES, 2C y 3D. Además, se calculó la entropía de Shannon normalizada de las dos poblaciones virales (Tabla 5.10). De nuevo, los virus procedentes de suero y de páncreas no mostraron diferencias en la complejidad del espectro de mutantes.

En un análisis más exhaustivo de las variaciones genéticas entre las tres poblaciones virales, se calculó la relación entre mutaciones no sinónimas y sinónimas en los espectros de mutantes. De nuevo, el análisis no mostró diferencias que pudieran explicar los distintos fenotipos observados (Tabla 5.9 y Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Complejidad del espectro de mutantes de las poblaciones de VFA de páncreas y suero del ratón número 8 del pase 1, determinada por clonaje biológico

Población viral	Número de clones analizados	Sustituciones/nucleótidos (frecuencia de mutación mínima) ^a	Sustituciones/nucleótidos (frecuencia de mutación máxima) ^b	S_n^c	NS/S ^d
Páncreas	5	3/40.575 (7.4×10^{-5})	3/40.575 (7.4×10^{-5})	0.826	1/2=0,5
Suero	5	4/40.575 (9.9×10^{-5})	4/40.575 (9.9×10^{-5})	0.826	1/1=1

^a Frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones diferentes dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.

^b La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones dividido por el número total de nucleótidos secuenciados.

^c S_n , entropía de Shannon normalizada, se calcula como $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, donde p_i es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y N es el número de genomas comparados (apartado 4.16) (Volkenstein, 1994).

^d NS/S es la relación entre mutaciones no sinónimas (NS) y sinónimas (S).

Además, para establecer si existía un desbalance en los tipos de transiciones y transversiones, se comparó el número de cada una de ellas (Tabla 5.11). Las tres poblaciones virales presentaron una distribución similar en los tipos de mutaciones, con mayor número de transiciones que de transversiones, siendo el cambio de U→C el más abundante en todas ellas. No se observaron diferencias significativas en el número de

transiciones y transversiones entre las poblaciones virales analizadas (test exacto de Fisher, $p < 0,05$), aunque se apreció una tendencia de los virus de suero y bazo a presentar mayor número de transversiones que los virus de páncreas.

Tabla 5.11. Tipos de mutaciones encontradas en las poblaciones virales de páncreas, suero y bazo del ratón número 8 del pase 1

Población viral	Transiciones					Transversiones ^a					Ts/Tv ^b
	U→C	C→U	G→A	A→G	Total	U→G	G→U	G→C	A→C	Total	
Páncreas	8 (47%)	3 (18%)	4 (24%)	1 (6%)	16	1 (6%)	0	0	0	1	16
Suero	9 (47%)	2 (11%)	2 (11%)	3 (16%)	16	0	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	3	5,3
Bazo	13 (54%)	1 (4%)	2 (8%)	0	16	1 (4%)	2 (8%)	4 (17%)	1 (4%)	8	2

Las mutaciones representadas son las encontradas en el análisis del espectro de mutantes mediante clonaje biológico y molecular de las poblaciones virales de páncreas, suero y bazo descrito en la Tabla 5.9. Los números entre paréntesis indican el porcentaje del tipo de mutación con respecto al número total de mutaciones halladas en la misma población.

^a Las transversiones C→G, U→A, A→U y C→A no se observaron en ninguna de las poblaciones virales analizadas.

^b Ts/Tv es la relación entre el número total de transiciones (Ts) y el número total de transversiones (Tv).

En conclusión, los datos sugieren que las diferencias en virulencia para ratón de las poblaciones virales de suero, páncreas y bazo no pueden ser atribuidas a diferencias en la diversidad genómica de las cuasiespecies virales, al menos según los métodos analíticos disponibles actualmente.

5.1.7- Detección de subpoblaciones de los virus de páncreas con distinta virulencia para ratón

Dados los resultados obtenidos, se planteó como hipótesis que una diferente composición en genomas de la cuasiespecie, no reflejada en la complejidad del espectro de mutantes, pudiera ser el determinante de la virulencia viral *in vivo*. Para determinar si

era posible rescatar subpoblaciones virales de suero y páncreas por diferencias en la velocidad de replicación en BHK-21, se transfectó RNA viral de suero o páncreas de los ratones número 8 y 10 (Figura 5.2) en células BHK-21. Un control positivo transfectado con RNA de C-S8c1 fue incluido en el ensayo. Se escogió la transfección de RNA viral en vez de la infección con virus para evitar cualquier posible modificación en la composición del espectro de mutantes debida a la entrada selectiva del virus en las células BHK-21 y obtener, de esta manera, una representación más amplia de la población viral original. Se recogió el virus extracelular bien a tiempos tempranos (24-36 horas) post-transfección (cuando el efecto citopático afectaba al 20% de las células BHK-21) o bien a tiempos tardíos (48-69 horas) post-transfección (cuando se observaba efecto citopático completo) (descrito en el apartado 4.15.2 de Materiales y Métodos). Se ensayó la virulencia en ratón de cada una de estas subpoblaciones virales. Para ello, se inocularon grupos de 4-8 ratones en la AP con 10^4 PFU de los distintos virus (Tabla 5.12). Las subpoblaciones virales de suero y C-S8c1 recuperadas a tiempos tempranos y tardíos post-transfección y los virus de páncreas recuperados a tiempos tempranos post-transfección manifestaron una virulencia en ratón similar a la del virus parental C-S8c1, causando la muerte de los ratones inoculados entre las 36-48 hpi. Sin embargo, los virus de páncreas recuperados a tiempos tardíos post-transfección mostraron un fenotipo atenuado en ratón. La diferencia de virulencia en ratón entre los virus de páncreas recuperados a tiempos tardíos post-transfección y las demás subpoblaciones virales incluidas en el ensayo (virus de páncreas recuperados a tiempos tempranos post-transfección, y virus de suero y C-S8c1 recogidos a tiempos tempranos y tardíos post-transfección) fue estadísticamente significativa (Tabla 5.12).

Para los tiempos tempranos post-transfección se obtuvieron además de subpoblaciones virales extracelulares, subpoblaciones virales intracelulares, mediante congelación y descongelación de las células BHK-21 transfectadas con RNA viral de suero, páncreas ó C-S8c1 (apartado 4.7). No se observaron diferencias significativas entre los índices de supervivencia de los ratones inoculados con virus intracelulares y los de los ratones inoculados con virus extracelulares recuperados a tiempos tempranos post-transfección (test exacto de Fisher, $p < 0,05$) (Tabla 5.12).

Tabla 5.12. Virulencia en ratón del VFA recuperado a tiempos tempranos o tardíos post-transfección de células BHK-21 con RNA viral

RNA viral ^a	Extensión de EC (%) ^b	Virulencia en ratón:	
		% supervivencia [(n° supervivientes/n° inoculados)x100] a las 48 hpi ^c	
		Subpoblación viral extracelular	Subpoblación viral intracelular
C-S8c1	20	25 (1/4)	0 (0/6)
	100	0 (0/8)	ND ^d
Suero #8	20	0 (0/4)	0 (0/6)
	100	0 (0/4)	ND ^d
Suero #10	20	ND ^d	0 (0/6)
	100	0 (0/8)	ND ^d
Páncreas #8	20	0 (0/4)	17 (1/6)
	100	75 (3/4) ^{e,f}	ND ^d
Páncreas #10	20	0 (0/8)	17 (1/6)
	100	100 (8/8) ^{e,f}	ND ^d

^a Se extrajo RNA viral de C-S8c1 (control positivo) o de suero o páncreas de los ratones 8 y 10 del pase 1 (la numeración de los ratones corresponde a la de la Figura 5.2); el RNA se utilizó para transfectar células BHK-21 y recuperar virus infeccioso (apartado 4.15.2).

^b Se recogieron los virus resultantes de las transfecciones cuando el efecto citopático (EC) afectaba al 20% o 100% de las células BHK-21.

^c La virulencia en ratón de los virus recuperados tras la transfección se expresa como el porcentaje de ratones supervivientes, inoculados en la AP con 10⁴ PFU, a las 48 hpi. Entre paréntesis se indica el número de ratones supervivientes entre el número total de ratones inoculados.

^d ND, no determinado.

^e La reducida virulencia mostrada por estos virus, calculada en horas de supervivencia de los ratones inoculados hasta un total de 168 horas, con respecto a los demás virus descritos en esta tabla, es estadísticamente significativa (ANOVA de un factor, $p < 0.0001$).

^f El porcentaje de supervivencia a las 48 hpi de los ratones inoculados con estas subpoblaciones de páncreas es estadísticamente mayor al de los ratones inoculados con C-S8c1 recogido al 100% EC [test exacto de Fisher, planteamiento bilateral $p = 0.04$ (para el virus de páncreas #8) y $p = 0.0002$ (para el virus de páncreas #10)]. Además, el virus de páncreas #10 recogido al 100% EC es significativamente menos virulento que el virus de suero #10 recogido al 100% EC y las subpoblaciones intracelulares y extracelulares de C-S8c1 recuperado al 20% EC y del virus de páncreas #10 recogido al 20% EC (test exacto de Fisher, planteamiento bilateral $p \leq 0.04$).

En resumen, únicamente las subpoblaciones de páncreas recuperadas a tiempos tardíos post-transfección, pero no las recuperadas a tiempos tempranos, presentaron un fenotipo atenuado en ratón. Se estudió si, al igual que sucedía en las poblaciones virales derivadas de páncreas y de suero (ver Tabla 5.8), en estos virus obtenidos en cultivo de células se observaba una correlación positiva entre la infectividad específica y la virulencia en ratón. Para ello, se calculó la infectividad específica de los virus resultantes de las transfecciones de RNA viral de C-S8c1 y de suero y páncreas de los ratones 8 y 10 del pase 1 (Tabla 5.13). Todos los virus analizados, atenuados y virulentos para ratón, presentaron valores de infectividad específica similares, sugiriendo que la virulencia en ratón no está directamente relacionada con la infectividad específica de los virus, medida en células BHK-21.

Tabla 5.13. Infectividad específica de los virus recuperados tras la transfección de células BHK-21 con RNA viral

RNA viral ^a	Extensión de EC (%) ^b	Infectividad específica (PFU/moléculas RNA viral) ^c
C-S8c1	20	ND ^d
	100	$(7,3 \pm 5,9)10^{-5}$
Suero #8	20	ND ^d
	100	$(3,9 \pm 4,4)10^{-4}$
Suero #10	20	ND ^d
	100	$(3,5 \pm 2,8)10^{-5}$
Páncreas #8	20	$(1,7 \pm 0,8)10^{-5}$
	100	$(2,7 \pm 0,1)10^{-5}$
Páncreas #10	20	$(2,0 \pm 1,5)10^{-4}$
	100	$(6,6 \pm 2,0)10^{-4}$

^a Mismos símbolos que en Tabla 5.12, leyenda ^a

^b Mismos símbolos que en Tabla 5.12, leyenda ^b

^c La infectividad específica se expresa como el número de PFU dividido entre el número de moléculas de RNA viral. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Se representan los valores medios y las desviaciones estándar.

^d ND, no determinado. En estas muestras no fue posible extraer RNA por la limitada cantidad de la que se disponía.

Adicionalmente, para determinar si las subpoblaciones virales de páncreas de distinta virulencia en ratón presentaban diferencias en su secuencia consenso, se secuenció el genoma completo de los virus extracelulares recuperados a tiempos tempranos y tardíos post-transfección, pero no se observaron diferencias (Figura 5.9). Por lo tanto, a pesar de que una distinta velocidad de replicación en células BHK-21 transfectadas capturó las diferencias en virulencia para ratón de las dos subpoblaciones virales, de nuevo no se encontró ninguna variación genética que pudiera asociarse al fenotipo atenuado.

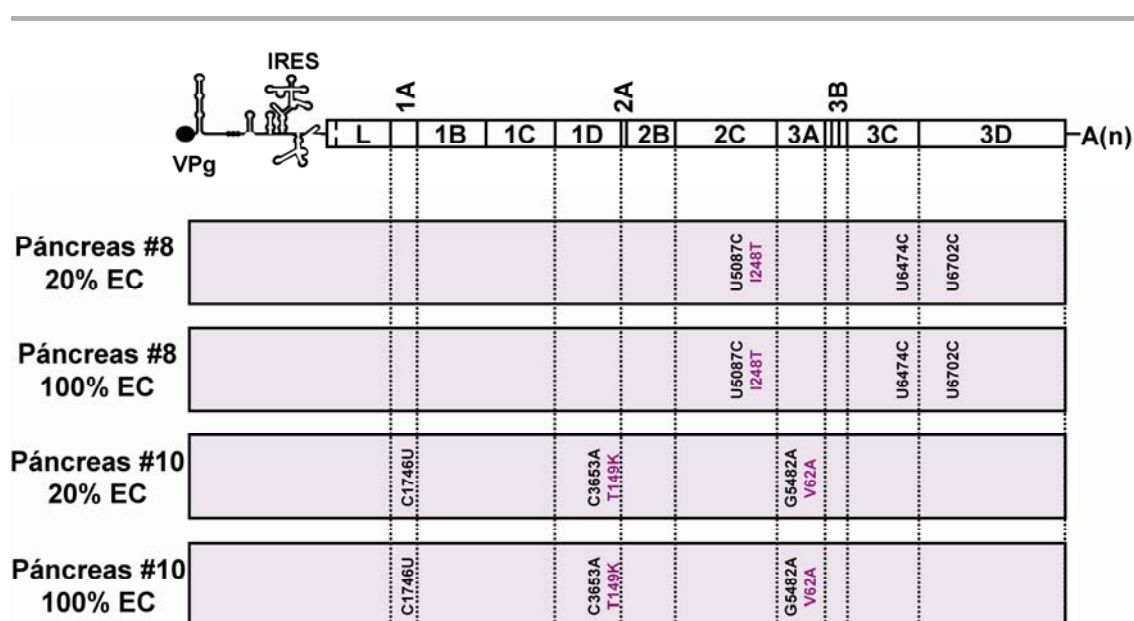


Figura 5.9. Esquema de la secuencia consenso del genoma completo de los virus obtenidos de los sobrenadantes de las transfecciones de células BHK-21 con RNA viral de páncreas. Páncreas #8 y Páncreas #10, indica el virus extracelular recogido tras la transfección de células BHK-21 con RNA viral de páncreas del ratón 8 o del páncreas del ratón 10 del pase 1, respectivamente (la numeración de los ratones corresponde a la de la Figura 5.2). 20% EC y 100% EC indica el porcentaje de células BHK-21 con efecto citopático (EC) tras la transfección del RNA viral, en el momento en que fue recogido el sobrenadante viral. Los rectángulos morados representan la secuencia del genoma completo de las poblaciones virales. Se indican los cambios de nucleótido observados (en negro) y los correspondientes cambios de aminoácido (en violeta) con respecto a la secuencia del virus parental C-S8c1. La primera letra corresponde al nucleótido o aminoácido encontrado en la secuencia de C-S8c1 y el número a la posición del residuo. Los aminoácidos se representan utilizando el código de una letra (descrito en abreviaturas).

Todos estos resultados sugieren que los tipos de genomas que conforman el espectro de mutantes de una cuasiespecie de VFA y sus interacciones, son decisivos en la patogénica para ratón de la población viral resultante (ver Discusión, apartado 6.4).

5.2- Análisis de la virulencia en ratón de poblaciones de VFA mutagenizadas

5.2.1- Mutagénesis del virus de la fiebre aftosa C-S8c1 con ribavirina

Se ha documentado con distintos virus que el uso de mutágenos en infecciones en cultivo de células provoca un aumento en las frecuencias de mutación. Este incremento en la complejidad del espectro de mutantes lleva a la pérdida de infectividad y en algunos casos a la extinción viral (Crotty *et al.*, 2000; Sierra *et al.*, 2000; Pariente *et al.*, 2001; Grande-Pérez *et al.*, 2002; Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004). En ensayos *in vivo*, se ha demostrado que el tratamiento con 5-fluorouracilo (FU) de ratones inmunodeficientes evita el establecimiento de infecciones persistentes de LCMV (Ruiz-Jarabo *et al.*, 2003).

Dados estos antecedentes, se planteó como objetivo el análisis de la relación entre el aumento de complejidad del espectro de mutantes del VFA y su virulencia en ratón. Para incrementar la frecuencia de mutación y la diversidad de la cuasiespecie de VFA C-S8c1, se llevaron a cabo nueve pases seriados del virus en cultivo de células BHK-21 en presencia de 5 mM de ribavirina (R) (apartado 4.6.2) (Figura 5.10). Se eligió esta concentración de R para optimizar la mutagénesis de VFA C-S8c1 y disminuir la probabilidad de seleccionar variantes de resistencia a R (Sierra *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2008; Perales *et al.*, 2009) (Rubén Agudo, datos no publicados). La viabilidad de células BHK-21 a 5 mM de R es del 53% a las 24 horas y del 40% a las 48 h (Rubén Agudo, datos no publicados).

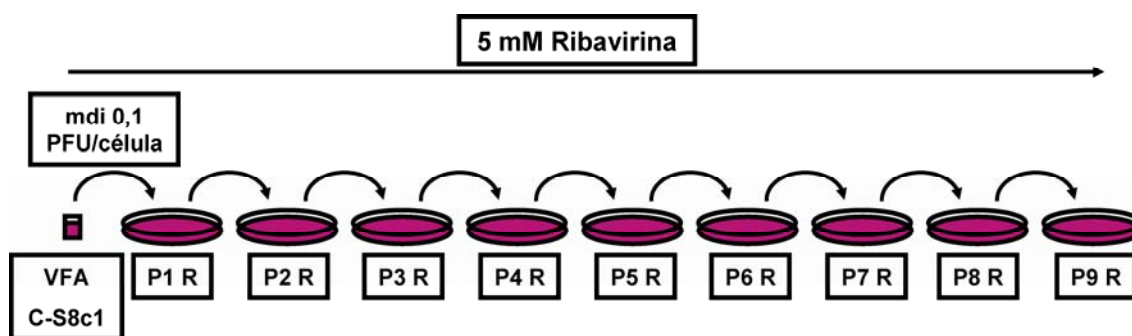


Figura 5.10. Esquema de pases seriados de VFA C-S8c1 en células BHK-21 en presencia de 5 mM de ribavirina (R). Las flechas indican infecciones seriadas en células BHK-21; P seguido de un número y de R indica el número de pase en presencia de 5 mM de R. El P1 R es la población viral en el sobrenadante a las 24 horas post-infección de una infección de células BHK-21 con C-S8c1 (considerado pase 0) a una mdi de 0,1 PFU/célula en presencia de 5 mM de R. Las subsiguientes infecciones se realizaron con un volumen de 200 μ l del sobrenadante del pase anterior y los virus se recogieron en todos los casos a las 24 horas post-infección (apartado 4.6.2).

Se determinó el título viral por ensayos de plaqueo en células BHK-21 y el número de moléculas de RNA viral por RT-PCR a tiempo real en cada uno de los pases de VFA C-S8c1 en presencia de R (Figura 5.11 A). Se observó una disminución muy pronunciada tanto en el título viral (aproximadamente dos órdenes de magnitud) como en el número de moléculas de RNA viral (2,5 órdenes de magnitud) en el pase 1 con respecto al pase 0 (VFA C-S8c1 parental). En pases posteriores se observaron fluctuaciones en torno a los valores alcanzados en el pase 1, y en concreto se detectó una ligera recuperación del título viral y el número de moléculas de RNA viral en los pases 3 y 4, tras los cuales volvió a disminuir. El pase 9 presentó un título viral dos órdenes de magnitud inferior y una disminución en el número de moléculas de RNA viral de tres órdenes de magnitud con respecto al pase 0. Además, las curvas del título viral y del número de moléculas de RNA viral mostraron cierto paralelismo a lo largo de los pases. La infectividad específica, por tanto, fluctuó a lo largo de los pases alrededor de un valor constante (Figura 5.11 B).

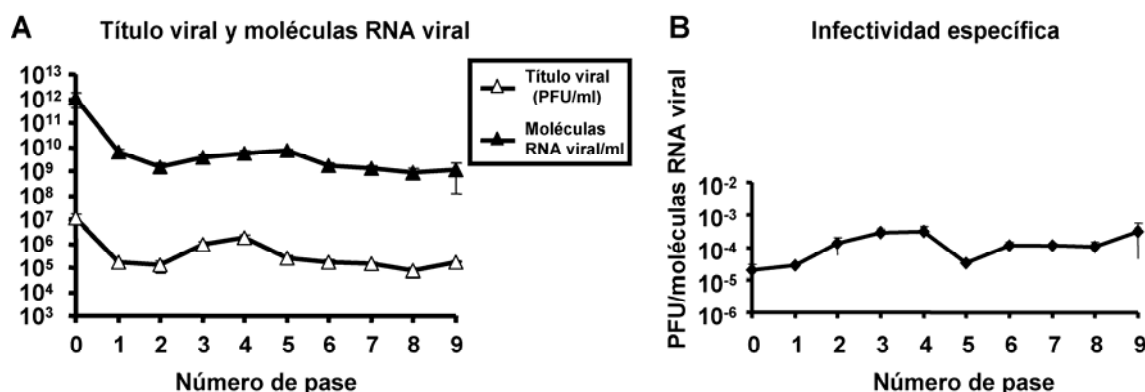


Figura 5.11. Producción viral e infectividad específica de poblaciones de VFA pasadas en presencia de ribavirina. En la parte A, se representa el número de PFU/ml de sobrenadante y el número de moléculas de RNA viral/ml de sobrenadante en los nueve pases seriados en presencia de R en relación al virus parental C-S8c1 (pase 0). El esquema de los pases está descrito en la Figura 5.10. En la parte B, se indica la infectividad específica, o el número de PFU dividido por el número de moléculas de RNA viral, de las poblaciones virales resultantes de los pases seriados en presencia de R, y C-S8c1 (pase 0). Las determinaciones se hicieron por triplicado; se representan los valores medios y las desviaciones estándar.

5.2.2- Virulencia en ratón de poblaciones del virus de la fiebre aftosa obtenidas tras infecciones seriadas en presencia de ribavirina

Para analizar la virulencia *in vivo* de las poblaciones de VFA mutagenizadas con R, se inocularon ratones en la AP con 10^3 PFU de los virus resultantes de los pases 1, 4, 7 y 9 de C-S8c1 en presencia de R (Figura 5.12 A y B). Dadas las limitaciones experimentales, 10^3 PFU fue la máxima dosis que se pudo inocular. Los ratones inoculados se sometieron a seguimiento clínico durante 30 días, aunque a partir del séptimo día post-inoculación no se vieron variaciones. El porcentaje de supervivencia aumentó con el número de pases en presencia de R, llegando a ser del 83,3% (16,7% de mortalidad) en el pase 7 y el 9, a diferencia del virus parental C-S8c1, que fue del 0% (100% de mortalidad) entre las 36 y 48 hpi. La reducida virulencia para ratón de los pases 7 y 9, pero no la de los pases 1 y 4, en presencia de R con respecto a C-S8c1 a los 7 días post-inoculación es estadísticamente significativa (test exacto de Fisher, planteamiento bilateral $p=0,02$).

Para estudiar un posible efecto de la propia R a una concentración de 5 mM en las determinaciones de virulencia, se inocularon ratones con una mezcla de 10^3 PFU de

C-S8c1 y 5 mM de R (Figura 5.12 B). El índice de supervivencia de los ratones inoculados con la mezcla no varió con el obtenido con C-S8c1 en ausencia de R. Sin embargo, se observó un retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad y la mortalidad, produciéndose el total de muertes entre las 36 y 120 hpi. Dado que los virus inoculados se diluyeron en DMEM, se añadieron como controles negativos del ensayo tres grupos de ratones inoculados con DMEM, DMEM con R 5 mM o con el sobrenadante de un pase en células BHK-21 no infectadas, crecidas en DMEM en presencia de R 5 mM (Figura 5.12 B). Ninguno de los ratones presentó síntomas de enfermedad ni murió durante el periodo de desarrollo del experimento (30 días). Estos resultados sugieren que el tratamiento del VFA C-S8c1 en cultivo de células BHK-21 con 5 mM de R reduce la virulencia del virus en ratón.

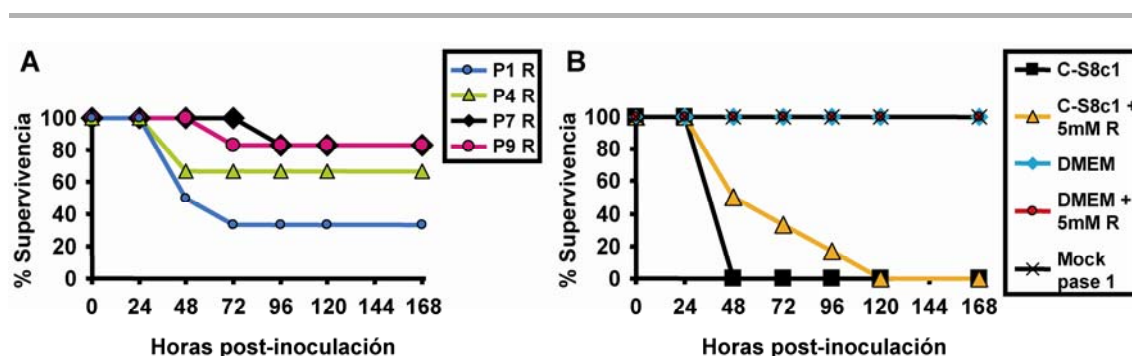


Figura 5.12. Virulencia para ratón de las poblaciones de C-S8c1 de los pases 1, 4, 7 y 9 en células BHK-21 en presencia de R. Se inocularon grupos de seis ratones en la AP con 10^3 PFU de cada uno de los virus o medios de cultivo que se indican en los cuadros de la derecha de cada gráfica. Se representan los porcentajes de supervivencia de los ratones inoculados en un periodo de seguimiento de 168 horas. Las muestras se representan en dos gráficas, parte A y B, para una mejor visualización. En la parte A se muestran los porcentajes de supervivencia de los ratones inoculados con las poblaciones virales procedentes de pases seriados de C-S8c1 en cultivo de células BHK-21 en presencia de R. La nomenclatura de los virus P1 R, P4 R, P7 R y P9 R corresponde a la descrita en la Figura 5.10. En la parte B se representan los controles positivos en los que los ratones fueron inoculados con C-S8c1 o con una mezcla de C-S8c1 y 5 mM de R, y los controles negativos en los que los ratones fueron inoculados con DMEM (medio en el que fueron diluidos los virus), DMEM con una concentración de R de 5 mM, o el sobrenadante de un cultivo de células BHK-21 no infectadas, mantenidas en DMEM, en presencia de R 5 mM (Mock pase 1). La virulencia, calculada como la relación entre ratones vivos y muertos a las 168 horas post-inoculación, de P7 R y P9 R es significativamente menor que las de C-S8c1 y la mezcla de C-S8c1 y 5 mM de R (test exacto de Fisher, planteamiento bilateral $p=0,02$).

Con el fin de calcular con más exactitud la disminución de virulencia en ratón de los virus pasados en células BHK-21 en presencia de R, se determinó la dosis letal 50 (LD₅₀), o dosis viral necesaria para matar al 50% de los ratones inoculados, de la población viral recuperada del pase 9 en presencia de R. Para ello, se inocularon grupos de ratones con 10¹, 10², 10³ ó 10⁴ (dosis máxima posible) PFU de dicho virus (Figura 5.13).

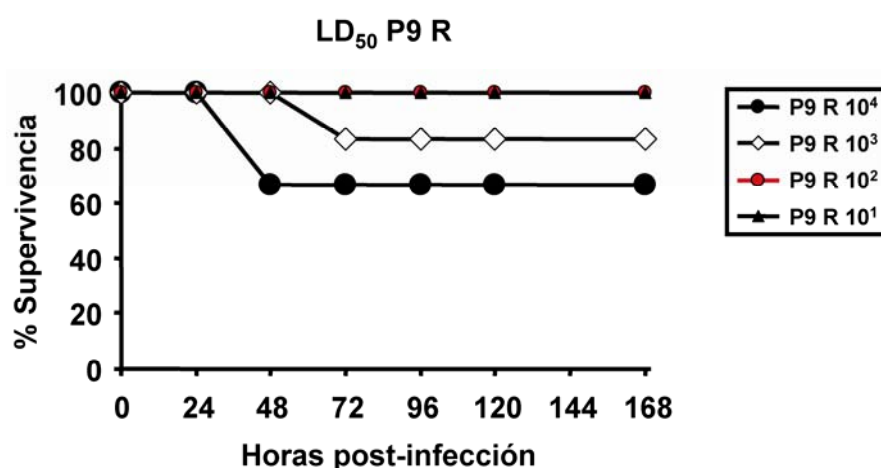


Figura 5.13. LD₅₀ de la población viral de P9 R. Se inocularon grupos de seis ratones con dosis crecientes (10-10⁴ PFU) del virus en la AP. La nomenclatura del virus corresponde a la descrita en la Figura 5.10. Se representa el porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados en un periodo de seguimiento de 168 horas post-inoculación. La LD₅₀ calculada a partir de los datos representados en la figura es mayor a 10⁴ PFU.

Se observó un incremento de la LD₅₀ de la población viral mutagenizada (mayor de 10⁴ PFU, calculado a partir de los datos de la Figura 5.13) de más de 200 veces con respecto a la del virus parental [LD₅₀ de 50 PFU, descrito en (Salguero *et al.*, 2005) y otros ensayos de letalidad de C-S8c1 no mostrados]. Estos datos confirman que la mutagénesis de C-S8c1 con R en cultivo de células BHK-21 conduce a la pérdida de virulencia del virus para ratón.

5.2.3- Patogenia en ratón de clones biológicos aislados de la población viral del pase 9 en presencia de ribavirina

Resultados anteriores sugirieron que la actividad antiviral de la mutagénesis es debida a dos mecanismos: la pérdida de información genética causada por la acumulación de mutaciones deletéreas o letales en los genomas virales y la interferencia ejercida por variantes defectivos sobre los genomas viables de la población viral (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004; Grande-Perez *et al.*, 2005). Para determinar si la atenuación en ratón de la población viral del pase 9 en presencia de R (P9 R) era debida a la pérdida de virulencia de todos los variantes del espectro de mutantes por la acumulación de mutaciones deletéreas o si, por el contrario, podía ser consecuencia de la interferencia ejercida por estos mutantes sobre los variantes patogénicos, se analizó la virulencia en ratón de cinco clones procedentes de la población viral estudiada. Los clones fueron aislados mediante ensayos de plaqueo en células BHK-21 (apartado 4.6.3.2) y se inocularon en ratón, sin ser previamente crecidos en células BHK-21 para evitar la recuperación del virus y la posible alteración del fenotipo en ratón. Se inocularon grupos de seis ratones con 10^3 PFU de cada clon biológico (Figura 5.14).

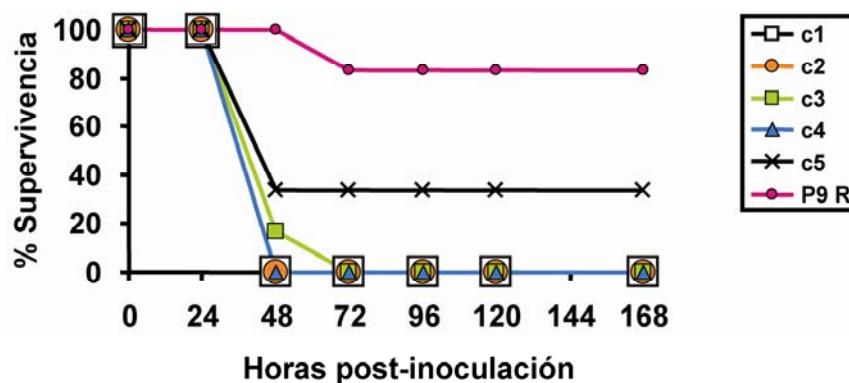


Figura 5.14. Virulencia para ratón de cinco clones biológicos de la población viral de P9 R (la nomenclatura del virus se corresponde con la descrita en la Figura 5.10). Se inocularon grupos de seis ratones con 10^3 PFU de cada uno de los clones biológicos de P9 R denominados c1, c2, c3, c4 y c5. Se representa el porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados con dichos clones en relación con el porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados con 10^3 PFU de la población viral de P9 R (descrito previamente en la Figura 5.12) en un periodo de seguimiento de 168 horas post-inoculación.

Los cinco clones mostraron una virulencia para ratón superior a la de la población viral de la que procedían. Cuatro de ellos presentaron un fenotipo similar al del virus de referencia C-S8c1, causando la enfermedad y muerte de todos los ratones inoculados entre las 36 y las 72 hpi. Las diferencias de virulencia en ratón entre cada uno de estos cuatro clones (c1, c2, c3 y c4) y la población viral del pase 9 en presencia de R a las 72 hpi y a los 7 días post-infección es estadísticamente significativa (test exacto de Fisher, planteamiento bilateral $p=0,02$). Únicamente uno de los clones (clon c5) con un índice de supervivencia del 33,3%, mostró pérdida de virulencia en ratón con respecto a C-S8c1. En conclusión, la población del pase 9 contiene variantes patogénicos a pesar de presentar un fenotipo atenuado en ratón. Esto sugiere la presencia de variantes no patogénicos en el espectro de mutantes que interfieren con los mutantes patogénicos presentes en la misma población.

5.2.4- Análisis de las secuencias consenso de virus de la fiebre aftosa sometidos a pases en presencia de ribavirina

Con el objeto de analizar si la pérdida de virulencia en ratón de los virus tratados con R podía asociarse a alguna mutación impuesta en la población viral, se analizó la secuencia consenso del genoma completo del pase 9 en presencia de R (P9 R). No se observaron cambios, a excepción de una única mutación en mezcla con la secuencia wt: I248T/I (en proporción 70% T-30% I) en la proteína 2C (Figura 5.15). Ésta es la misma mutación detectada previamente en órganos de ratones infectados con C-S8c1 (apartado 5.1.4). Para determinar si dicha mutación aparecía en poblaciones virales de pases previos, se amplificó y secuenció una región genómica que comprendía parte de 2C y 3A de los pases 1, 4 y 7 en presencia de R (P1 R, P4 R y P7 R) (Figura 5.15). P1 R mostró una secuencia consenso wt en la región genómica secuenciada; sin embargo, en P4 R y P7 R ya se observó la presencia de la mutación I248T/I en mezcla, en proporciones 50% T-50% I y 60% T-40% I, respectivamente.

Dado que la mutación I248T/I en la proteína 2C se encontraba en mezcla en la población viral del pase 9, se comprobó si los clones biológicos procedentes de la misma, cuya virulencia en ratón había resultado superior a la de la población y comparable en la mayoría de los casos a la del virus parental C-S8c1, también la presentaban (Figura 5.15). Los cinco clones biológicos que habían sido previamente

inoculados en ratón mostraban el cambio I248T, indicando que el fenotipo atenuado observado en ratón no podía estar asociado, al menos exclusivamente, a esta mutación.

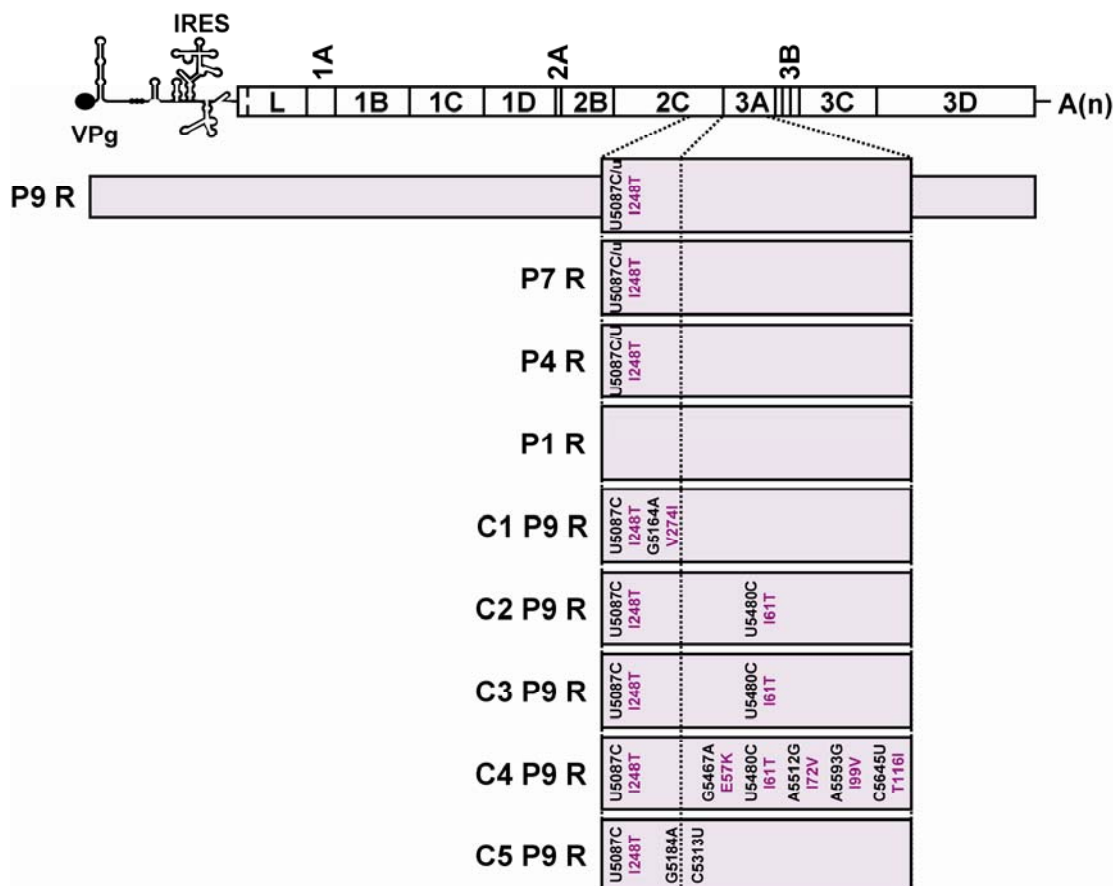


Figura 5.15. Esquema de la secuencia consenso de las poblaciones P9 R, P7 R, P4 R y P1 R y de los clones biológicos c1, c2, c3, c4 y c5 de la población viral P9 R. Se representa la secuencia consenso del genoma completo de P9 R y la secuencia de la región genómica comprendida entre los nucleótidos 4945-5677 (parte de 2C y 3A) de las poblaciones P7 R, P4 R y P1 R y de los clones c1, c2, c3, c4 y c5 procedentes de la población viral P9 R. La nomenclatura de los virus se corresponde con la descrita en la Figura 5.10. Se indican los cambios de nucleótido observados (en negro) y los correspondientes cambios de aminoácido (en violeta) con respecto a la secuencia del virus parental C-S8c1. La primera letra corresponde al nucleótido o aminoácido encontrado en la secuencia de C-S8c1 y el número a la posición del residuo. En la posición 5087 C y U mayúsculas separadas por una barra indican mezcla de ambos nucleótidos en una proporción equivalente; la u minúscula indica una mezcla de nucleótidos con mayor proporción de C. C corresponde al aminoácido T248 y U a I248. Los aminoácidos se representan utilizando el código de una letra (descrito en abreviaturas).

5.2.5- Estudio de la complejidad del espectro de mutantes del virus de la fiebre aftosa sometido a pases en presencia de ribavirina

Análisis previos de tratamientos con R de células BHK-21 persistentemente infectadas con VFA mostraron aumentos en la frecuencia de mutación del espectro de mutantes de 8-10 veces y en la entropía de Shannon normalizada de 4,6-5,4 veces para la región genómica 3D, con respecto a poblaciones de VFA no tratadas (Airaksinen *et al.*, 2003). Del mismo modo, en infecciones citolíticas de VFA en presencia de R se observaron aumentos en la frecuencia de mutación de entre 2,2-6,5 veces y en la entropía de Shannon normalizada de entre 0,2-5 veces para la región genómica 3D con respecto a poblaciones virales pasadas en ausencia de R (Sierra *et al.*, 2007). Además, ambos estudios indicaron una dominancia de las transiciones C→U y G→A en las poblaciones tratadas con R (32 de un total de 40 mutaciones en los tratamientos de células persistentes y 96 de 117 mutaciones en los pases citolíticos).

Para comprobar si el tratamiento con R en este ensayo también producía un aumento en la complejidad de la cuasiespecie que pudiera estar relacionada con la pérdida de virulencia para ratón, se analizaron los espectros de mutantes de C-S8c1 y P9 R (apartado 5.2.1 de Resultados). Se calcularon la frecuencia de mutación y la entropía de Shannon normalizada de la región genómica 3D comprendida entre los nucleótidos 6800 y 7773 para las dos poblaciones analizadas (Tabla 5.14). La población viral P9 R mostró incrementos de 20,6 veces para la frecuencia de mutación mínima, 30,9 veces para la frecuencia de mutación máxima y de 10 veces para la entropía de Shannon normalizada con respecto a C-S8c1. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de mutaciones diferentes por clon, y el número total de mutaciones por clon, entre los espectros de mutantes de las poblaciones P9 R y C-S8c1 (t-student para datos no pareados de dos colas, $p < 0.0001$). Estos datos están de acuerdo con los aumentos de complejidad previamente descritos para el VFA tras el tratamiento con R (Airaksinen *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2007). Los resultados sugieren que la pérdida de virulencia en ratón de poblaciones de VFA tratadas con R está relacionada con el aumento en la complejidad de la cuasiespecie.

Tabla 5.14. Complejidad del espectro de mutantes de P9 R y C-S8c1

Población viral ^a	Región del genoma ^b	Número de clones analizados	Nº de nucleótidos ^c	Frecuencia de mutación mínima ^d	Frecuencia de mutación máxima ^e	S_n^f
C-S8c1	3D (6800-7773)	30	29220	$6,8 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-5}$	0,09
P9 R	3D (6800-7773)	27	26298	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	0,9

^a La nomenclatura de las poblaciones virales se corresponde con la descrita en la Figura 5.10.

^b Se analizó la secuencia de la región genómica 3D comprendida entre los nucleótidos 6800 y 7773. La numeración de residuos del genoma del VFA es la descrita en (Escarmis *et al.*, 1996).

^c Número de nucleótidos secuenciados de cada población viral.

^d La frecuencia de mutación mínima es el número de mutaciones diferentes dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.16).

^e La frecuencia de mutación máxima es el número total de mutaciones encontradas dividido por el número total de nucleótidos secuenciados para cada población (apartado 4.16).

^f S_n , indica entropía de Shannon normalizada, que es una medida de la proporción de secuencias distintas en una distribución. Se calcula como $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, donde p_i es la frecuencia de cada secuencia en la cuasiespecie y N es el número de genomas comparados (apartado 4.16 de Materiales y Métodos) (Volkenstein, 1994). Se calculó la entropía de Shannon normalizada para las dos poblaciones virales, analizando la región genómica comprendida entre los residuos 6800 y 7773 de cada clon molecular.

Para determinar si el espectro de mutantes de la población viral P9 R presentaba la desviación en el tipo de mutaciones previamente descrita para poblaciones de VFA tratadas con R, se comparó el número de cada una de ellas (Tabla 5.15). El número total de mutaciones diferentes observadas en la población P9 R fue significativamente mayor al número de mutaciones encontradas en el espectro de mutantes de C-S8c1 (37 frente a 2). Además, las transiciones dominaron sobre las transversiones en la población tratada con R, siendo las transiciones C→U y G→A las mayoritarias (40,5% y 37,8%, respectivamente, del total de mutaciones). Estas transiciones son las esperadas tras la incorporación de la R cuando se comporta como análogo de G o, cuando ya incorporada la R en el molde de RNA, se incorpora con más frecuencia el uracilo que la citosina. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en estudios anteriores (Airaksinen *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2007) (Rubén Agudo, datos no publicados).

Tabla 5.15. Tipos de mutaciones encontradas en los espectros de mutantes de P9 R y C-S8c1

Población viral ^a	Transiciones					Transversiones ^b			Ts/Tv ^c
	U→C	C→U	G→A	A→G	Total	U→G	A→C	Total	
C-S8c1	0	1 (50%)	0	0	1	1 (50%)	0	1	1
P9 R	5 (13,5%)	15 (40,5%)	14 (37,8%)	2 (5,4%)	36	0	1 (2,7%)	1	36

Las mutaciones indicadas son las encontradas en el análisis de los espectros de mutantes de C-S8c1 y P9 R descrito en la Tabla 5.14. Los números entre paréntesis indican el porcentaje del tipo de mutación con respecto al número total de mutaciones halladas en la misma población.

^a La nomenclatura de las poblaciones virales se corresponde con la descrita en la Figura 5.10.

^b Las transversiones C→G, G→C, U→A, A→U, G→U y C→A no se observaron en las poblaciones virales analizadas.

^c Ts/Tv es la relación entre el número total de transiciones (Ts) y el número total de transversiones (Tv).

En conclusión, el tratamiento con R del VFA en cultivo de células conduce al aumento de la complejidad de la cuasiespecie y a la pérdida de virulencia de la población viral en ratón.

5.2.6- Análisis estructural de las mutaciones encontradas en la polimerasa en la cuasiespecie de la población viral del pase 9 en presencia de ribavirina

Resultó interesante estudiar los cambios de aminoácido encontrados en el espectro de mutantes de la población P9 R (apartado 5.2.5) en el contexto de la estructura tridimensional de la polimerasa del VFA (apartado 2.6.2.2), para predecir posibles alteraciones de su actividad enzimática. Para ello, se localizaron los residuos mutados en la estructura cristalina de la polimerasa del VFA (Ferrer-Orta *et al.*, 2004; Ferrer-Orta *et al.*, 2007), mediante el programa *PyMol* (apartado 4.17). De las 37 sustituciones de nucleótido diferentes observadas en el análisis por clonaje molecular de la región genómica 3D (que codifica la polimerasa) de la población P9 R, 14 causaron cambio de aminoácido. Una de estas 14 mutaciones, en la posición 210, dio lugar a un codón de terminación (Stop), por lo que al menos una de las polimerasas de los clones analizados no era funcional. De las 13 mutaciones restantes, nueve se sitúan en el

dominio *fingers* (T91M, D106N, D114N, G140R, A146V, E151A, E171K, E286K y E293K) y cuatro en el dominio *palm* (V239M, V326I, T363I e I364V) de la polimerasa (Figura 5.16). Todos estos cambios se encontraron en clones moleculares diferentes, exceptuando E171K e I364V que se observaron en el mismo clon.

El residuo 171 se localiza en el motivo conservado F implicado en la interacción con el nucleótido entrante y con la cadena molde del RNA. Los aminoácidos 364 y 363 interaccionan con residuos del motivo conservado A, implicado en el reconocimiento de la base nitrogenada del nucleótido entrante y, por lo tanto, en fidelidad de copia. Estos tres residuos están situados en el contorno externo del canal de entrada del nucleótido. El cambio V239M se encuentra dentro del motivo conservado A y ha sido previamente observado en el espectro de mutantes de una población del VFA tratada con R (Airaksinen *et al.*, 2003).

El residuo E293 se encuentra en el bucle $\beta 9\text{-}\alpha 11$, que está implicado en la interacción con el nucleótido entrante, y el residuo E286 se ubica en la lámina $\beta 9$ que precede a dicho bucle. En el bucle $\beta 9\text{-}\alpha 11$ se localiza la mutación M296I de resistencia a R (Sierra *et al.*, 2007). De forma interesante, la mutación E286K apareció en mezcla acompañando a M296I durante pases seriados del VFA en presencia de R (Sierra, 2007).

La localización de los residuos 171, 363, 364, 239, 293 y 286 sugiere que los cambios observados pueden afectar al reconocimiento del nucleótido entrante y, por tanto, a la incorporación de RMP por la polimerasa.

Las demás mutaciones se encuentran más alejadas del centro catalítico y no parece que puedan influir directamente en el reconocimiento del nucleótido entrante. Cinco de estos cambios (T91M, V326I, G140R, A146V, E151A) se encuentran expuestos en la superficie externa de la polimerasa. Curiosamente, tres de ellos (G140R, A146V, E151A) se sitúan en una misma hélice ($\alpha 5$) de la proteína. Por otro lado, las sustituciones D106N y D114N, están ubicadas en un bucle flexible que interacciona con el RNA de doble banda y podrían afectar a la unión de la polimerasa con el RNA sintetizado.

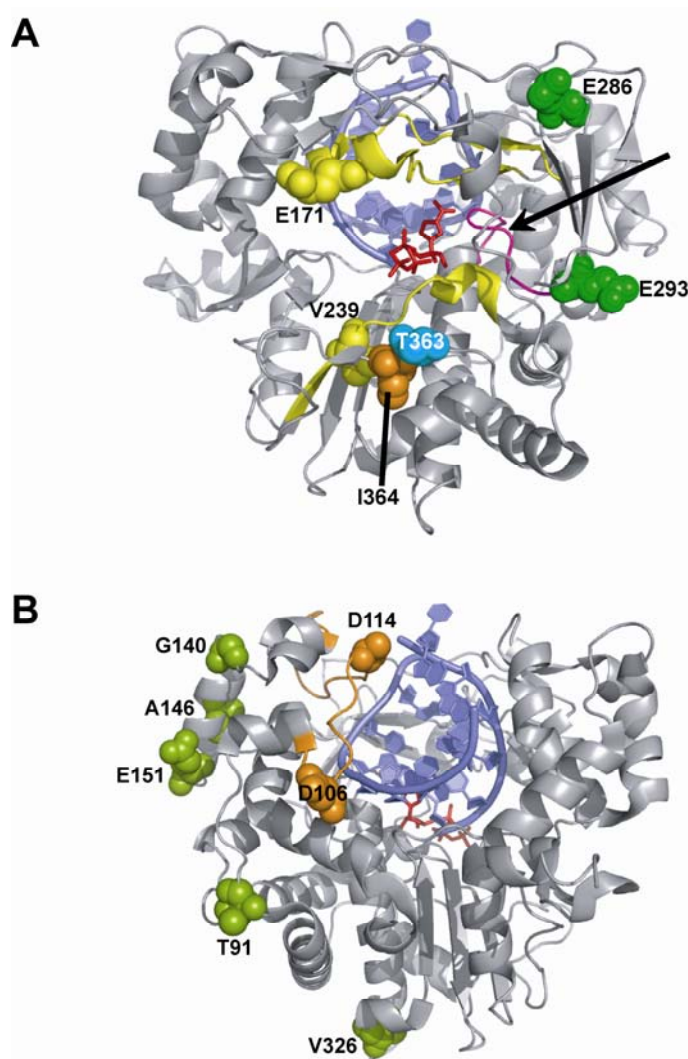


Figura 5.16. **Localización de los residuos alterados en la población P9 R en la estructura tridimensional de la polimerasa del VFA.** Se indica la posición correspondiente a los cambios de aminoácido encontrados en el espectro de mutantes de la población viral P9 R (la nomenclatura del virus es la descrita en la Figura 5.10). Se representa la polimerasa en forma de lazos de color gris, el nucleótido entrante (RTP) en rojo y el RNA molde-cebador de doble banda en azul. En la parte A se muestra una vista posterior de la polimerasa, en la que el canal de entrada del nucleótido está en primer plano. En amarillo, se resaltan los motivos conservados F y A, donde se localizan los residuos E171 y V239, respectivamente. El bucle $\beta 9\text{-}\alpha 11$ (en rosa y señalado con una flecha) está implicado en el reconocimiento del nucleótido entrante. En la parte B, se muestra una vista frontal de la polimerasa, con el canal de entrada del RNA molde y el canal de salida del RNA de doble banda en primer plano. En el bucle comprendido entre las posiciones 104 y 127 (en naranja), que está implicado en el reconocimiento del RNA molde entrante, se encuentran los residuos D114 y D106 alterados en el espectro de mutantes de la población P9 R. En verde, se representan los aminoácidos alterados que se hallan expuestos en la superficie externa de la polimerasa.

En conclusión, el análisis estructural sugiere que ninguno de los cambios observados, a excepción de Q210Stop, eliminan la actividad enzimática, aunque es posible que algunos de ellos provoquen alteraciones de actividad o estén implicados en la adaptación del VFA a replicar en presencia de altas concentraciones de R. Este análisis abre la posibilidad de identificar polimerasas adicionales con alteraciones de actividad que puedan afectar la eficacia biológica de los virus que las expresen y que puedan contribuir a la interferencia asociada a mutagénesis incrementada, como se ha documentado previamente con otros mutantes de la polimerasa (Perales *et al.*, 2007)

6. Discusión

6.-Discusión

6.1- La replicación del VFA en ratón da lugar a la selección de subpoblaciones virales con propiedades fenotípicas alteradas

La estructura en cuasiespecies, ampliamente descrita para los virus RNA, confiere a las poblaciones virales un gran potencial adaptativo *in vivo* (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005; Domingo, 2006; Vignuzzi *et al.*, 2006). La capacidad de generar un espectro de mutantes complejo no sólo permite la adaptación de un virus a distintos hospedadores, sino también a tejidos diferentes dentro de un mismo hospedador. El conocimiento de la dinámica evolutiva de las poblaciones de virus RNA *in vivo* es fundamental para el entendimiento de la patogenia viral. En esta Tesis Doctoral, se han estudiado las propiedades del VFA, como modelo de virus RNA, en infecciones *in vivo*.

En primer lugar, se ha evaluado la selección de variantes virales en un contexto complejo como es la adaptación a replicar en un tejido específico. La compartimentación anatómica de un órgano puede dar lugar a la subdivisión de la cuasiespecie viral en grupos semi-aislados de menor tamaño, que difieran en términos de fenotipo y/o ventaja selectiva. Para investigar la contribución de factores específicos de un tipo de célula o tejido en la selección de estos variantes, se llevaron a cabo pases seriados del virus en páncreas de ratón.

El virus de referencia VFA C-S8c1 inoculado subcutáneamente en ratones mostró propensión a invadir el páncreas del ratón a las 24 hpi, causando una inflamación pancreática aguda y destrucción del tejido acinar (apartado 5.1). Cuando el virus aislado de páncreas fue inoculado en ratones naïve, el virus mostró un fenotipo atenuado, con bajo índice de mortalidad de los ratones inoculados incluso a la máxima dosis viral probada (10^4 PFU) (apartado 5.1.3.1). Además, el virus se propagó y replicó en todos los órganos principales analizados, incluido el páncreas (apartado 5.1.3.2), aunque a niveles más bajos que el virus parental C-S8c1. Estos datos sugieren, en primer lugar, que el virus procedente de páncreas no muestra un tropismo discernible preferencial para el páncreas y, en segundo lugar, que la replicación del VFA en páncreas da lugar a una subpoblación viral de menor eficacia biológica y virulencia en ratón que la población parental. Para citomegalovirus también se ha descrito un fenómeno relacionado, en el que la producción de virus en un órgano dio lugar a una

subpoblación viral con propiedades alteradas con respecto al virus parental. Los virus procedentes de hígado, órgano en el que se registró la mayor cantidad de virus durante una infección sistémica en ratón, no fueron los causantes de la diseminación del virus en el hospedador (Sacher *et al.*, 2008). En nuestro sistema, parece que la diferencia entre VFA C-S8c1 y su progenie de páncreas en relación a la virulencia para ratón no está relacionada con la habilidad para replicar solamente en ciertos tejidos de ratón.

En el análisis de la carga viral en páncreas de ratones inoculados con VFA C-S8c1, se observó que el título viral no variaba proporcionalmente al número de moléculas de RNA viral entre distintos ratones, mostrando diferencias en las infectividades específicas de entre menos de 1 y más de 5 unidades logarítmicas (apartado 5.1.1). No obstante, las infectividades específicas de variantes del VFA C-S8c1 con una historia de pases en células BHK-21 se encuentran en el rango de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} PFU/molécula de RNA viral (Verdaguer *et al.*, 1997; Escarmis *et al.*, 2008). Por ello, no resulta sorprendente que poblaciones virales procedentes de la replicación del VFA C-S8c1 en ratón presenten valores de infectividad específica, medidos en células BHK-21, aún más bajos. Sin embargo, no se puede atribuir el comportamiento fenotípico de las poblaciones virales de páncreas a su infectividad específica, ya que los virus procedentes de las transfecciones del RNA viral de páncreas, mantuvieron el fenotipo atenuado de la población viral original, a pesar de presentar valores de infectividad específica más altos y comparables a los mostrados por poblaciones virulentas en ratón, como C-S8c1 o el virus procedente de suero (apartado 5.1.7). El título viral indica el número de partículas virales capaces de formar placa en células BHK-21, mientras que el número de moléculas de RNA viral incluye los genomas viables, capaces o no capaces de formar placas en células BHK-21, y los genomas no viables. Por este motivo, es posible que las diferencias en infectividad específica entre los virus procedentes de páncreas de distintos ratones se deban, al menos en parte, al estadio de la infección en el páncreas en el momento del sacrificio (a las 24 hpi). Durante la infección en el páncreas, no solo hay producción de partículas virales, sino también destrucción de las mismas por el sistema inmunitario, e incluso, por componentes celulares que se activan y liberan tras la muerte de las células infectadas. Entre estos componentes de las células pancreáticas se podrían encontrar las proteasas celulares, que aunque se ha comprobado que no inactivan el virus tras la muerte del animal (apartados 5.1.1 y 5.1.3.1), es posible que jueguen un papel importante durante el desarrollo de la infección en el páncreas del ratón. No obstante,

para determinar las causas de las diferencias en infectividad específica de las poblaciones virales de páncreas, sería necesario estudiar la cinética de replicación del VFA en páncreas e investigar los factores virales y del hospedador que influyen en el desarrollo de la infección viral.

6.2- Durante la replicación del VFA C-S8c1 en ratón se seleccionan virus con alteraciones genéticas en las regiones genómicas del *cre*, L, 2C y 3A

Se estudió si la diferencia en virulencia entre C-S8c1 y sus derivados pancreáticos se podía asociar a algún cambio genético. La caracterización molecular de las poblaciones virales de páncreas reveló la aparición de diversas mutaciones, localizadas en su mayoría en las regiones genómicas que codifican las proteínas no estructurales del virus L, 2C y 3A (apartado 5.1.4.1). Igualmente, la región genómica del *cre*, altamente conservada y de tan solo 54 nucleótidos de longitud, presentó dos cambios de nucleótido en las poblaciones virales analizadas, lo que supuso una frecuencia de mutación en esta región genómica aproximadamente diez veces mayor ($3,7 \times 10^{-3}$ sustituciones por nucleótido) a la frecuencia de mutación media en el resto del genoma ($3,6 \times 10^{-4}$ sustituciones por nucleótido). Además, muchas de las mutaciones encontradas en *cre*, L, 2C y 3A en las poblaciones virales de páncreas se observaron también en las poblaciones virales de otros órganos (pulmón, corazón y bazo) de un mismo animal (apartado 5.1.4.2), sugiriendo un papel para estas regiones genómicas en la adaptación del VFA a ratón.

Los cambios más llamativos observados en el análisis molecular de las poblaciones virales de páncreas fueron I85V e I248T en la proteína 2C, ya que se encontraron de forma repetida en distintos ratones (apartado 5.1.4.1). La virulencia en ratón de los transcritos infecciosos con cada una de estas mutaciones fue similar a la del virus parental C-S8c1, sugiriendo que estas mutaciones no eran las responsables del fenotipo atenuado en ratón. Sin embargo, la alta frecuencia con que estos cambios se encontraron en distintas poblaciones virales de páncreas, y su aparición en las poblaciones virales procedentes de otros órganos de un mismo ratón, ponen de manifiesto la relevancia de I85V e I248T en la proteína 2C en la adaptación de VFA C-S8c1 a replicar en ratón. La aparición de mutaciones en la proteína 2C como

consecuencia de la adaptación del VFA o de otros picornavirus a distintos ambientes tanto en cultivo de células como *in vivo* ha sido descrita previamente (Escarmis *et al.*, 1996; Nuñez *et al.*, 2001; Emerson *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2002; Harris & Racaniello, 2003; Pariente *et al.*, 2003; Carrillo *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2007). Resulta importante destacar que, en concreto, las sustituciones I85V e I248T en 2C se observan cuando C-S8c1 se somete a diversas presiones selectivas o regímenes poblacionales. Así, el cambio I85V apareció tras pases placa a placa de C-S8c1 en cultivos de células BHK-21 y no desapareció tras pases a alta mdi, indicando que no era una mutación deletérea para el virus (Escarmis *et al.*, 1996; Escarmis *et al.*, 1999). La sustitución I248T se seleccionó durante la adaptación de C-S8c1 a cobaya, acompañada por las mutaciones Q44R en la proteína 3A y L147P en la proteína VP1 (Nuñez *et al.*, 2001). Se demostró que I248T, en combinación con K169R en 2C, confiere resistencia al inhibidor de la replicación cloruro de guanidinio; ambos cambios se seleccionaron tras pases seriados de C-S8c1 en presencia de este inhibidor de la replicación viral (Pariente *et al.*, 2003). I248T también apareció durante pases seriados en presencia de altas concentraciones de R, tanto del virus C-S8c1 (apartado 5.2.4) como de un triple mutante de C-S8c1 que expresa una polimerasa con P44S, P169S y M296I (Rubén Agudo, datos no publicados). La sustitución I248T en 2C, en el contexto del triple mutante de la polimerasa de C-S8c1, mejoró la eficacia biológica del virus tanto en presencia como en ausencia de R. Además, estudios *in vitro* sugirieron que la proteína 2C con la mutación I248T presentaba resistencia a la inhibición de la actividad NTPasa ejercida tanto por cloruro de guanidinio como por R, a diferencia de la proteína 2C wild-type cuya actividad NTPasa era inhibida por ambos (Rubén Agudo, datos no publicados). Todas estas evidencias, atribuyen a la proteína 2C un papel central en la replicación y en la adaptación del virus a diferentes presiones selectivas.

El elevado número de sustituciones de nucleótido en *cre*, y de mutaciones no sinónimas en las regiones genómicas que codifican las proteínas L y 3A, tanto en las poblaciones virales de páncreas como en las poblaciones virales de otros órganos del ratón, sugiere la posible implicación de estas regiones genómicas en la adaptación del VFA C-S8c1 a ratón. En el análisis estructural de las mutaciones encontradas se observó que los cambios no eran incompatibles con el mantenimiento de la función biológica. Por un lado, la predicción de la estructura de *cre* mostró que las sustituciones de nucleótido halladas conducían a un aumento en la ΔG y, por lo tanto, a la formación de estructuras con menor estabilidad. Se ha sugerido que para la uridilación de la VPg

en el inicio de la replicación se requiere la apertura del *cre*, dando lugar a un RNA desapareado que sería reconocido por las proteínas 3C ó 3CD (Amero *et al.*, 2008); por tanto, la menor estabilidad de la estructura de *cre* podría facilitar el inicio de la replicación. Por otro lado, las sustituciones I107T, T90A y D184N encontradas en la proteasa L, se localizan en residuos expuestos en la superficie de la proteína. Además, los aminoácidos I107 y T90, que se hallan sustituidos por T107 y A90 en los virus de páncreas de los ratones 1 y 2, respectivamente, contactan entre sí en la estructura tridimensional de la proteína (apartado 5.1.4). La proximidad de estos aminoácidos sugiere que esta región de L podría tener una función importante, quizá en alguna interacción con factores del hospedador. En análisis moleculares comparativos de múltiples aislados del VFA se ha observado que la proteasa L exhibe gran variabilidad y se ha propuesto que alteraciones en esta proteína pueden estar implicadas en la adaptación evolutiva del virus a distintos ambientes (Carrillo *et al.*, 2005; Mohapatra *et al.*, 2008). También se ha sugerido un papel en virulencia para esta proteína asociado a su función en la regulación de las respuestas de interferón del hospedador (apartado 2.6.2.2) (Piccone *et al.*, 1995; Grubman *et al.*, 2008). Del mismo modo, alteraciones en la proteína 3A se han relacionado con variaciones de tropismo celular, rango de hospedador y virulencia tanto del VFA (Giraud *et al.*, 1990; Beard & Mason, 2000; Nuñez *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2003) como de otros picornavirus (Harris & Racaniello, 2005). Los datos obtenidos sugieren que las mutaciones encontradas en las proteínas L y 3A se seleccionan durante la adaptación del VFA a ratón. Sin embargo, parece que no son la causa de la pérdida de virulencia en ratón de las poblaciones virales de páncreas, debido ya que: i) las mutaciones en las proteínas L y 3A aparecen en distintos órganos de un mismo animal y ii) no todas las poblaciones virales de páncreas analizadas presentan mutaciones en alguna de estas dos proteínas a pesar de mostrar un fenotipo atenuado en ratón. De todas formas, no se puede descartar un posible efecto de las mutaciones en L y 3A en la atenuación de las poblaciones virales de páncreas.

En resumen, los datos indican que las mutaciones observadas en las regiones genómicas *cre*, L, 2C y 3A de las poblaciones virales de páncreas podrían estar implicadas en la adaptación del VFA C-S8c1 a ratón. Sin embargo, no parece que estas mutaciones sean las responsables del fenotipo atenuado mostrado por las poblaciones virales de páncreas. Por lo tanto, es posible que las alteraciones genéticas causantes de la atenuación no se encuentren reflejadas en las secuencias consenso.

6.3- Las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas procedentes de un mismo ratón inoculado con VFA C-S8c1 muestran distintos grados de virulencia *in vivo*

Hasta el momento, se han caracterizado dos tipos de determinantes de virulencia para las poblaciones de picornavirus: los asociados a alteraciones genéticas en la secuencia consenso de determinadas regiones genómicas (Baranowski *et al.*, 1998; Harris & Racaniello, 2003; Herrera *et al.*, 2007) y los que dependen de la complejidad genética de la población viral como tal (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005; Vignuzzi *et al.*, 2006). En nuestro sistema, la replicación del VFA C-S8c1 en un ratón individual condujo a la aparición de subpoblaciones virales en suero, bazo y páncreas que mostraron distinta virulencia para ratón (apartado 5.1.5). Así, todos los ratones inoculados con el virus procedente de páncreas sobrevivieron, mientras que la población viral de suero causó un 100% de mortalidad. El virus de bazo presentó un fenotipo intermedio entre las poblaciones virales de páncreas y suero, provocando la muerte del 50% de los ratones inoculados a la misma dosis de infectividad viral. Sin embargo, no se observaron diferencias en las secuencias consenso (apartado 5.1.5) o en la complejidad de los espectros de mutantes (apartado 5.1.6) entre estas tres poblaciones virales.

La comparación fenotípica de las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas procedentes de un mismo ratón puso de manifiesto que una cuasiespecie viral puede comprender múltiples subpoblaciones que evolucionan independientemente en tejidos diferentes de un mismo hospedador infectado. Análisis realizados con VIH-1, en los que se documentó la presencia de subpoblaciones virales genéticamente diferentes en órganos distintos e incluso en regiones diferentes de un mismo órgano, también certifican que los diversos órganos y tipos celulares en un organismo constituyen un ambiente rico para la selección de variantes virales (Wong *et al.*, 1997; van't Wout *et al.*, 1998; Shapshak *et al.*, 1999; van Rij *et al.*, 2000). No se puede excluir, sin embargo, que algunas de las mutaciones observadas en estos trabajos puedan haber resultado de la deriva genética. Recientemente, en un estudio realizado con el VP se demostró que los tejidos introducían distintas presiones selectivas que podían representar cuellos de botella poblacionales en la propagación viral, dando lugar a subpoblaciones con una representación reducida de la cuasiespecie inicial (Pfeiffer & Kirkegaard, 2006). Los

cuellos de botella conducen a la aparición de mutaciones deletéreas en la secuencia consenso y a una reducción en la complejidad de la cuasiespecie de las poblaciones virales (Escarmis *et al.*, 2006; Pfeiffer & Kirkegaard, 2006). No obstante, los datos obtenidos en el análisis genético comparativo de las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas de un mismo ratón mostraron que las secuencias consenso y la complejidad de los espectros de mutantes podían mantenerse tras la replicación del VFA C-S8c1 en tejidos del ratón, a pesar de las grandes diferencias en virulencia manifestadas por estos virus (apartados 5.1.5 y 5.1.6). Una posible explicación podría ser que la atenuación fuera debida a la estabilidad limitada de la cápsida de los virus encapsidados en el bazo y el páncreas. Sin embargo, es poco probable que este factor contribuyera de forma importante porque el virus recogido a tiempos tardíos post-tranfección de células BHK-21 con RNA de páncreas mantuvo el fenotipo atenuado observado para la población viral recuperada directamente del páncreas.

La complejidad de los espectros de mutantes se determinó por frecuencias de mutación y entropías de Shannon normalizadas tanto de regiones genómicas específicas como de secuencias del genoma completo de clones biológicos y no se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de suero, páncreas y bazo (apartado 5.1.6). Además, el análisis de los espectros de mutantes por clonaje biológico y molecular tampoco mostró diferencias significativas entre las tres poblaciones respecto a otros parámetros, como la relación entre mutaciones sinónimas y no sinónimas, la relación entre transiciones y transversiones, o la proporción de cada tipo de transición o transversión. No obstante, se observó una tendencia de las poblaciones de bazo y suero a presentar mayor número de transversiones que los virus de páncreas, lo que sugiere que estos virus podrían haber completado un mayor número de rondas de replicación.

El análisis por clonaje molecular de las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas incluyó las regiones genómicas que codifican las proteínas VP1 y 2C completas, y parte de las regiones genómicas que codifican las proteínas 2B y 3A. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de mutaciones por clon en el conjunto de las cuatro regiones genómicas ni en cada una de ellas por separado entre las tres poblaciones virales analizadas (ANOVA de un factor, $p < 0,05$). Sin embargo, se distinguió una tendencia de la población viral de suero a mostrar mayor número de mutaciones en 2C y menor número de mutaciones en 2B, VP1 y 3A que la población viral de páncreas. Así, de las 15 mutaciones halladas en la población viral de suero 12 mapearon en 2C, 2 en 2B y 1 en VP1, mientras que de las 16 mutaciones

encontradas en las poblaciones virales de páncreas, 8 se hallaron en 2C, 4 en 2B, 2 en VP1 y 2 en 3A. La población viral de bazo presentó mayor número de mutaciones totales; sin embargo, la proporción de mutaciones en las distintas regiones genómicas analizadas fue intermedia entre las poblaciones virales de suero y de páncreas (15 mutaciones en 2C, 6 en 2B y 3 VP1). Por lo tanto, el patrón en la distribución de mutaciones con mayor proporción en la proteína 2C y menor proporción en las proteínas 2B, 3A y VP1 podría estar relacionado con el grado de virulencia de las poblaciones virales en ratón. Dado que las proteínas VP1, 2B, 2C y 3A están implicadas en virulencia (Beard & Mason, 2000; Nuñez *et al.*, 2001; Harris & Racaniello, 2003; Pacheco *et al.*, 2003; Harris & Racaniello, 2005; Herrera *et al.*, 2007), y que se ha documentado que una mutación puntual puede conducir a cambios importantes en la biología de diversos virus (Ahmed & Oldstone, 1988; Salvato *et al.*, 1991; Sitbon *et al.*, 1991; Szepanski *et al.*, 1992; Bae & Yoon, 1993), es posible que las mutaciones observadas en los espectro de mutantes otorguen a los genomas que las contienen un fenotipo virulento o atenuado en ratón. Alteraciones genéticas en otras regiones genómicas también pueden estar asociadas a la patogenia mostrada por los variantes de una cuasiespecie (las regiones del genoma del VFA implicadas en virulencia se detallan en el apartado 2.3.1). No obstante, para descifrar los determinantes moleculares de virulencia ocultos en los espectros de mutantes sería necesario analizar la secuencia completa de múltiples clones de las tres poblaciones virales y estudiar la virulencia *in vivo* asociada a los cambios observados. Los métodos actuales para estudiar poblaciones de genomas virales no permiten analizar genomas completos de clones moleculares, pero nuevas técnicas como los análisis por microarrays o secuenciación masiva podrían ayudar a identificar estas diferencias genéticas.

6.4- Modelo de la interacción entre diferentes variantes de la cuasiespecie del VFA como determinante de la virulencia *in vivo*

Para explicar los resultados obtenidos se propone como hipótesis que la virulencia en ratón de las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas está determinada por el tipo de variantes virales que componen el espectro de mutantes y sus interacciones, que podrían facilitar la replicación en ratón, sin el requisito de una firma genética específica asociada a virulencia. Así, los mutantes que conforman cada una de

las tres poblaciones virales pueden ser “patogénicos” o “no patogénicos” para ratón, ya sea individualmente o en el contexto del espectro de mutantes en el que se encuentran. Se propone un modelo según el cual las cuasiespecies del VFA de suero, bazo y páncreas estarían compuestas por genomas “patogénicos” y “no patogénicos” en distinta proporción (Figura 6.1). En las poblaciones virales recuperadas de páncreas la proporción de genomas “no patogénicos” sería mayor que la proporción de genomas “patogénicos”, mientras que las poblaciones virales de suero presentarían mayor proporción de genomas “patogénicos” que “no patogénicos”, entendiendo que los fenotipos “patogénico” y “no patogénico” es una propiedad del conjunto del espectro de mutantes, influida por interacciones entre productos génicos de los genomas individuales. El bazo, que es un órgano muy irrigado, estaría compuesto por una proporción intermedia de genomas “patogénicos” y “no patogénicos”. Los datos obtenidos a partir de las transfecciones de células BHK-21 con el RNA de páncreas apoyan esta hipótesis (apartado 5.1.7). Así, el virus recuperado a tiempos tempranos post-transfección fue patogénico para ratón, mientras que el virus recuperado a tiempos tardíos post-transfección fue no patogénico, mostrando que las poblaciones virales de páncreas contenían subpoblaciones de distintas virulencias en ratón. Además, el virus intracelular (partículas ensambladas a las 24-36 horas post-transfección) fue tan virulento en ratón como el virus extracelular a las mismas horas post-transfección, sugiriendo, de nuevo, que la atenuación corresponde a subconjuntos de genomas que replican y se ensamblan a horas tardías post-transfección. De esta manera, la cuasiespecie viral recogida a tiempos tempranos post-transfección estaría enriquecida por subconjuntos de genomas “patogénicos” en relación a su contraparte “no patogénica”, mientras que a tiempos tardíos la cuasiespecie estaría dominada por genomas “no patogénicos”.

Se han descrito dos mecanismos por los que la interacción entre diferentes genomas puede determinar la virulencia de una población viral. El primero de ellos consiste en que un conjunto de genomas “no patogénicos” puede suprimir a los genomas “patogénicos”, como se ha manifestado previamente con variantes atenuados y virulentos del VP en preparaciones de vacunas (Chumakov *et al.*, 1991), o en infecciones con mezclas de variantes de LCMV causantes del síndrome de la deficiencia de la hormona de crecimiento o no causantes de la enfermedad (Teng *et al.*, 1996). La supresión de variantes virales por el espectro de mutantes también se ha documentado en ensayos en cultivos de células (de la Torre & Holland, 1990; Gonzalez-Lopez *et al.*,

2004; Perales *et al.*, 2007). El segundo mecanismo se basa en la necesidad de que subconjuntos de genomas complementen entre sí para causar patología. Así, en un trabajo realizado con el VP, se demostró que la complementación de un mutante específico por un espectro de mutantes era necesaria para que el mutante llegara al cerebro de ratones susceptibles (Vignuzzi *et al.*, 2006). Dado que las poblaciones virales de páncreas están compuestas por subpoblaciones patogénicas y no patogénicas para ratón, el fenotipo atenuado resultante podría ser consecuencia de la supresión de los variantes “patogénicos” por los “no patogénicos”.

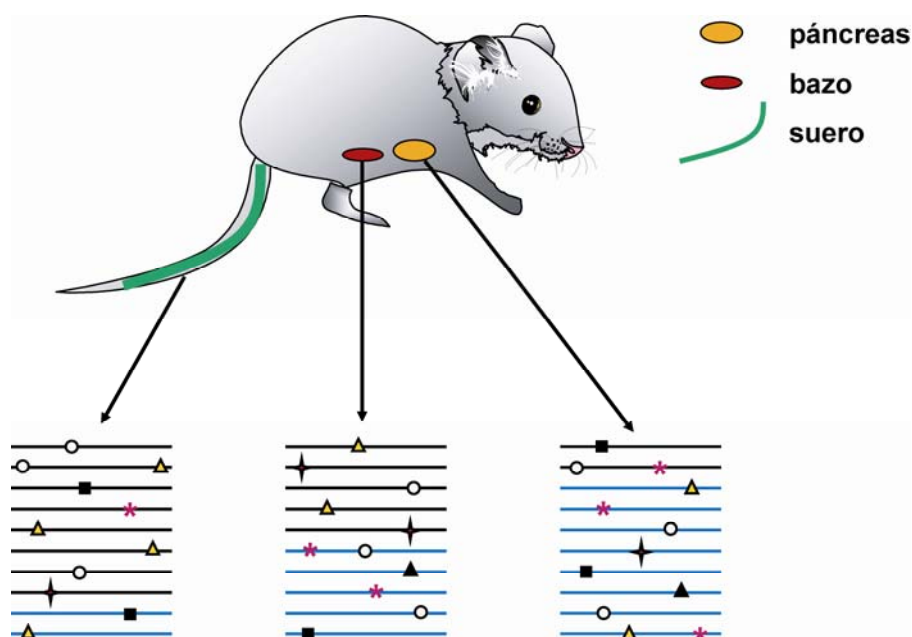


Figura 6.1. Modelo de la interacción entre diferentes variantes de la cuasiespecie del VFA como determinante de la virulencia *in vivo*. Las líneas horizontales representan genomas virales y los símbolos sobre las líneas indican mutaciones. Las poblaciones virales procedentes de suero, bazo y páncreas de un ratón individual infectado con el VFA C-S8c1 están compuestas por genomas “no patogénicos” (líneas azules) y genomas “patogénicos” (líneas negras) en distinta proporción. Una mayor proporción de genomas “patogénicos” que de genomas “no patogénicos” (virus de suero) daría lugar a virulencia en ratón. Una proporción intermedia de genomas “patogénicos” y “no patogénicos” (virus de bazo) daría lugar a una virulencia intermedia en ratón. Una cuasiespecie compuesta por una proporción mayor de genomas “no patogénicos” que de genomas “patogénicos” daría lugar a un fenotipo atenuado en ratón (virus de páncreas).

En el modelo que se propone (Figura 6.1), la dominancia de genomas “no patogénicos” sobre “patogénicos” en las poblaciones virales de páncreas podría deberse a que los genomas no patogénicos llegaran al páncreas en mayor proporción. También, debido a que el páncreas es un órgano poco irrigado, es probable que la relación entre virus y células susceptibles fuera baja, de manera que la falta de competición entre variantes virales facilitaría la replicación de los genomas atenuados o “no patogénicos”. Sin embargo, dado que los genomas “patogénicos” replican más rápido, como se observa en las transfecciones con RNA viral del páncreas (apartado 5.1.7), producirían más progenie en estadios tempranos de la infección y se verterían a la sangre en mayor proporción, enriqueciendo la cuasiespecie circulante con una mayor proporción de genomas “patogénicos”. Esto explicaría el fenotipo virulento de la población viral de suero. Por otra parte, el bazo es un órgano muy irrigado, de manera que el flujo de partículas virales sería mayor que en el páncreas y, por tanto, también la proporción de genomas “patogénicos”. En el caso del bazo hay que tener en cuenta que la perfusión no permite eliminar toda la sangre del tejido, por lo que cierta proporción de la población viral podría proceder de la sangre. En relación con este modelo, en un trabajo realizado con el virus de la polihedrosis nuclear se observó que el virus transmitido a tiempos tempranos post-infección de un hospedador infectado a otro susceptible era más virulento que el virus transmitido a tiempos tardíos, aunque este último era más productivo porque podía emplear más tejido del hospedador para la replicación (Cooper *et al.*, 2002).

6.5- La complejidad del espectro de mutantes como determinante de virulencia *in vivo*

La complejidad genética del espectro de mutantes es un factor determinante en la patogenia viral. Así, como se explica en el apartado 6.4, en trabajos con el VP se demostró que una disminución en la diversidad genética de la cuasiespecie comprometía la adaptabilidad del virus a ratones susceptibles (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005; Vignuzzi *et al.*, 2006). Además, en un estudio realizado con el Virus del Nilo Occidental se identificó el aumento en la diversidad genética de la población viral como uno de los factores implicados en la pérdida de virulencia del virus en ratón (Jerzak *et al.*, 2007). Del mismo modo, en ensayos en cultivo de células se ha documentado que el

incremento en la complejidad del espectro de mutantes de poblaciones virales tratadas con agentes mutagénicos está asociado a una disminución de la infectividad viral y en ocasiones a la extinción viral (Sierra *et al.*, 2000; Pariente *et al.*, 2001; Airaksinen *et al.*, 2003; Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004).

En esta Tesis Doctoral, se han investigado las consecuencias del aumento en la complejidad del espectro de mutantes del VFA, provocado por el tratamiento con el agente mutagénico ribavirina, en la patogenia viral en ratón.

6.5.1- El tratamiento de poblaciones de VFA C-S8c1 con ribavirina causa un aumento en la complejidad del espectro de mutantes y una disminución de la carga viral

Para la obtención de una población del VFA con una complejidad genética incrementada se llevaron a cabo nueve pases seriados de C-S8c1 en presencia de altas concentraciones de R (apartados 5.2.1). Tras la primera infección en cultivo de células BHK-21 se observó un descenso en el título viral y en el número de moléculas de RNA viral de 2 y 2,5 unidades logarítmicas, respectivamente (apartado 5.2.1). En pases posteriores, el título y el número de moléculas de RNA viral fluctuaron alrededor del valor alcanzado en el pase 1. Además, los valores de infectividad específica oscilaron a lo largo de los pases en torno a un valor constante y no se observaron descensos con respecto al virus parental (apartado 5.2.1). Se ha descrito que en el proceso de extinción viral mediado por agentes mutagénicos la infectividad específica disminuye (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004; Grande-Perez *et al.*, 2005b). Estos datos indican que la mutagénesis causada en el VFA C-S8c1 durante los nueve pases seriados en presencia de R no fue suficiente para conducir al virus a la extinción. Aunque es posible que para alcanzar la extinción viral se requiera un número mayor de pases o una concentración mayor del mutágeno, este resultado sugiere la selección de una mutación de resistencia a R. En el análisis de las secuencias consenso, se identificó en mezcla la mutación I248T en la proteína 2C, al menos desde el pase 4 en presencia de R (apartado 5.2.4). Dado que la función de la proteína 2C en la replicación viral depende de su actividad NTPasa (Teterina *et al.*, 1992; Mirzayan & Wimmer, 1994; Steil & Barton, 2009), la mutación en 2C podría estar implicada en la resistencia del virus al mutágeno. Como ya se ha comentado anteriormente el cambio I248T confirió resistencia a la inhibición de la actividad NTPasa de la proteína 2C por R *in vitro* (apartado 6.2). Además, se observó

que la sustitución I248T en el contexto de un triple mutante de la polimerasa de C-S8c1 aumentaba la eficacia biológica del virus en cultivo de células tanto en ausencia como en presencia de R (Rubén Agudo, datos no publicados). Así, la presencia de esta mutación pudo contribuir a que el título viral de C-S8c1 no disminuyera progresivamente durante los pases seriados en presencia de R. No obstante, la resistencia conferida por la sustitución I248T no fue suficiente para contrarrestar el efecto antiviral de R, dado que las poblaciones virales tratadas no alcanzaron los valores iniciales ni de título ni de número de moléculas de RNA viral (apartado 5.2.1). La determinación de la secuencia consenso del genoma completo de la población viral recuperada del pase 9 en presencia de R (P9 R), no mostró ningún cambio a excepción de la mutación I248T en 2C en mezcla (apartado 5.2.4).

En el análisis de los espectros de mutantes, la población viral P9 R presentó incrementos de 21 y 31 veces en la frecuencia de mutación (mínima y máxima, respectivamente) y de 10 veces en la entropía de Shannon normalizada con respecto a C-S8c1 (apartado 5.2.5). Por lo tanto, el tratamiento con R causó un gran aumento de la complejidad del espectro de mutantes de la población viral, a pesar de la presencia de la posible mutación de resistencia a R en la proteína 2C. Además, en el espectro de mutantes de la población P9 R, las mutaciones mayoritarias correspondieron a las transiciones G→A y C→U, que son las esperadas tras la incorporación de R como análogo de G o, cuando ya incorporada la R en el molde de RNA, se incorpora con más frecuencia el uracilo que la citosina (apartado 5.2.5). Estos datos están de acuerdo con la actividad mutagénica de R para el VFA previamente descrita (Airaksinen *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2007; Arias *et al.*, 2008).

6.5.2- El incremento en la complejidad del espectro de mutantes del VFA C-S8c1 conduce a la pérdida de virulencia en ratón

El porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados con las poblaciones virales tratadas con R fue aumentando progresivamente con los pases del virus en células BHK-21 en presencia de R. El índice máximo de supervivencia de los ratones inoculados se alcanzó con la población del pase 7 en presencia de R y se mantuvo con la población del pase 9 (apartado 5.2.2). Estos datos indican que la mutagénesis de C-S8c1 con R conduce a la pérdida de virulencia en ratón. La población P9 R mostró un valor de LD₅₀ en ratón más de 200 veces superior a la del virus parental C-S8c1 y un

aumento muy significativo, tanto de la frecuencia de mutación como de la entropía de Shannon normalizada (apartados 5.2.2 y 5.2.5). Por lo tanto, el incremento en la complejidad del espectro de mutantes está asociado a la atenuación de la población en ratón. Aunque en infecciones citolíticas de VFA en ausencia de R la frecuencia de mutación aumenta entre 2,2-6,5 veces menos y la entropía de Shannon normalizada entre 0,2-5 veces menos que en presencia de R (Sierra *et al.*, 2007) (Rubén Agudo, datos no publicados), actualmente estamos analizando la virulencia para ratón de C-S8c1 pasado en ausencia de R.

No se observó ninguna mutación en la secuencia consenso de la población P9 R, a excepción de I248T en 2C, que tal como se ha argumentado en los apartados 5.2.3, 5.2.4, 5.1.4.3 y 6.5.1, es improbable que sea la responsable de la disminución de virulencia en ratón. Estos datos refuerzan la hipótesis de que un aumento en la complejidad del espectro de mutantes puede conducir a la pérdida de virulencia *in vivo* de las poblaciones virales.

Los resultados apoyan el uso de agentes mutagénicos como estrategia antiviral, ya que ponen de manifiesto que no se requiere la extinción de la población para comprometer, mediante el aumento de la complejidad del espectro de mutantes, la patogenicidad asociada a la infección.

6.6- La supresión de genomas virulentos por genomas atenuados en una población del VFA tratada con ribavirina contribuye a la atenuación viral en ratón

Se han propuesto dos posibles mecanismos implicados en la pérdida de infectividad que precede a la extinción viral durante el proceso de mutagénesis letal (apartado 2.5). El primero es consecuencia directa de la mutagénesis incrementada y consiste en la acumulación de mutaciones deletéreas o letales que causa la pérdida de la información genética contenida en los genomas virales. El segundo mecanismo está basado en la presencia de variantes defectivos, con mutaciones deletéreas o letales causadas por la mutagénesis, que interfieren sobre los variantes viables. Aunque los dos mecanismos no son incompatibles, evidencias experimentales llevadas a cabo en cultivo de células con distintos virus RNA apoyan este segundo modelo, cuando la presión mutacional es limitada. Así, ensayos realizados con LCMV sugirieron que el

tratamiento con el agente mutagénico FU de células persistentemente infectadas con el virus favorecía la aparición de genomas defectivos (llamados defectores) que interferían con la replicación de genomas competentes, acelerando el proceso de extinción (Grande-Perez *et al.*, 2005a; Grande-Perez *et al.*, 2005b). Del mismo modo, se observó que el RNA preextinción de una población del VFA mutagenizada interfería sobre la replicación del virus parental no tratado con el mutágeno (Gonzalez-Lopez *et al.*, 2004). En un trabajo posterior se demostró que mutantes puntuales del VFA podían interferir sobre la replicación del virus estándar, y que para que se produjera la interferencia se requería que estos mutantes fueran competentes en replicación (Perales *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral refuerzan el papel de los genomas defectivos interferentes en la alteración de las propiedades de la población viral en su conjunto durante la mutagénesis. La cuasiespecie del P9 R mostró un fenotipo atenuado en ratón. Sin embargo, mutantes aislados de la misma presentaron una virulencia superior a la de la población y similar a la del virus de referencia C-S8c1, en la mayor parte de los casos (apartado 5.2.3). Estos datos sugieren fuertemente que la pérdida de virulencia en ratón de la población P9 R se debe a la existencia de genomas atenuados, originados por la acumulación de mutaciones deletéreas durante la mutagénesis, que suprimen a los variantes virulentos.

El análisis por clonaje molecular de la región codificante de la polimerasa de la población P9 R reveló numerosas sustituciones no sinónimas en el espectro de mutantes (apartado 5.2.6). Dado que la polimerasa es una proteína altamente conservada, muchas de estas mutaciones podrían afectar a la adaptabilidad o viabilidad de los genomas virales que las contienen. De las mutaciones observadas, una daba lugar a una polimerasa truncada, indicando que el mutante que la contenía no podía replicar por sí solo. Además, se identificaron sustituciones que podrían comprometer la interacción con el RNA o el nucleótido entrante, según la posición que ocupan los residuos mutados en la estructura tridimensional de la polimerasa (apartado 5.2.6). Estos datos sugieren que algunos de los variantes observados podrían estar interviniendo en la atenuación de la población P9 R, ejerciendo una acción interferente a través de polimerasas mutantes. Versiones alteradas del resto de proteínas y regiones genómicas del virus podrían estar igualmente implicadas en la interferencia llevada a cabo por los genomas atenuados. No obstante, será necesario un estudio más detallado de las mutaciones encontradas en este análisis para conocer su efecto en los genomas individuales y su influencia en las propiedades de la población viral en conjunto.

6.7- Las interacciones entre los componentes de la cuasiespecie modulan el desarrollo de las infecciones virales *in vivo*

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la importancia de las interacciones entre los componentes del espectro de mutantes de una cuasiespecie en la patogenia asociada a la infección viral. Se ha documentado la pérdida de virulencia en ratón de poblaciones virales con historias evolutivas distintas. Por un lado, las poblaciones virales procedentes de páncreas de ratones inoculados con VFA C-S8c1 y, por otro, la población viral resultante de nueve pases seriados del VFA C-S8c1 en cultivo de células en presencia del agente mutagénico ribavirina. A pesar de su fenotipo atenuado, estas poblaciones virales presentaron subconjuntos de genomas de mayor virulencia en ratón, sugiriendo que los genomas virulentos estaban siendo suprimidos por el espectro de mutantes circundante.

En la mayor parte de los casos, para que se establezcan interacciones entre los componentes del espectro de mutantes se requiere que dos o más variantes coinfecten una misma célula. Se han descrito varios mecanismos moleculares por los que un variante viral ejerce interferencia sobre otro [revisión en (Domingo *et al.*, 2006)]: i) una proteína defectiva sintetizada por un mutante puede formar parte de un complejo viral multiprotéico e inhibir su actividad; ii) componentes virales (regiones genómicas o proteínas) alterados pueden secuestrar factores necesarios para la replicación viral; iii) desbalances en la proporción de los genes virales pueden conducir a una disminución en la eficiencia de las etapas del ciclo vital del virus; iv) un virus interferente puede interaccionar con factores celulares más eficientemente que el virus interferido. En los espectros de mutantes en los que la frecuencia de variantes interferentes es elevada, estos pueden tener un efecto sinérgico inhibiendo la replicación del virus estándar por uno o varios de los mecanismos propuestos anteriormente.

Las interacciones entre variantes virales también pueden ser de carácter positivo, como es el caso de la complementación. Se ha descrito que los componentes de una cuasiespecie establecen principalmente interacciones positivas. Una evidencia de ello es que los clones biológicos aislados de una población suelen presentar menor eficacia biológica que la población en su conjunto (Domingo *et al.*, 1978; Duarte *et al.*, 1994). Una transición de interacciones positivas hacia negativas alteraría las propiedades biológicas de la cuasiespecie. Así, como se ha descrito en esta Tesis Doctoral, el

tratamiento con agentes mutagénicos aumenta la proporción de interacciones negativas por la acumulación de mutaciones deletéreas o letales en los genomas virales y esto compromete la patogenia asociada a la infección.

En conclusión, en esta Tesis Doctoral se ha profundizado en el conocimiento de la dinámica de las cuasiespecies virales *in vivo*. Los datos obtenidos apoyan la importancia de las interacciones entre los componentes del espectro de mutantes de una cuasiespecie en el desarrollo de una infección viral. Un conocimiento molecular más detallado de las interacciones dentro de los espectros de mutantes es esencial para mejorar el control de las infecciones virales en el futuro.

7. Conclusiones

7.-Conclusiones

- 1- Las poblaciones virales recuperadas de páncreas de ratones C57BL/6 inoculados con VFA C-S8c1 muestran un fenotipo atenuado en ratón. La pérdida de virulencia de estas poblaciones virales con respecto al virus parental VFA C-S8c1 no ha sido asociada a mutaciones impuestas en las secuencias consenso.
- 2- Las regiones genómicas *cre*, L, 2C y 3A acumulan alteraciones genéticas durante la replicación de VFA C-S8c1 en ratones C57BL/6.
- 3- Las poblaciones virales aisladas de suero de ratones C57BL/6 inoculados con VFA C-S8c1 presentan mayor virulencia *in vivo* que aquellas aisladas de páncreas y bazo. Las distintas virulencias en ratón mostradas por estas tres poblaciones virales no han sido asociadas a cambios en las secuencias consenso o a diferencias en la complejidad de los espectros de mutantes.
- 4- Se ha propuesto un modelo para las diferencias moleculares subyacentes a la virulencia en ratón de las poblaciones virales de suero, bazo y páncreas: una diferente proporción de genomas “patogénicos” y “no patogénicos”, y sus interacciones dentro de las cuasiespecies virales determinarían el fenotipo en ratón.
- 5- El tratamiento de VFA C-S8c1 con el agente mutagénico ribavirina en cultivo de células BHK-21 conduce a la pérdida de virulencia del virus en ratones C57BL/6. La población viral P9 R, resultante de nueve pases de VFA C-S8c1 en células BHK-21 en presencia de ribavirina, presenta una disminución de virulencia en ratón de más de 200 veces con respecto al virus parental, y esta atenuación se asocia a un aumento significativo en la complejidad del espectro de mutantes de la población viral.
- 6- La población P9 R contiene clones biológicos de mayor virulencia en ratón que la población en su conjunto, sugiriendo que en el contexto de la cuasiespecie estos subconjuntos de genomas de mayor virulencia están suprimidos por el espectro de mutantes circundante.

8. Bibliografía

8.-Bibliografía

- Acharya, R., E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands & F. Brown** (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**(6209), 709-716.
- Agol, V. I.** (2002). Picornavirus genetics: an overview. In: *Molecular Biology of Picornaviruses* (B. L. Semler & E. Wimmer, Eds.), pp. 269-284. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Agol, V. I.** (2006). Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**(211-59).
- Agudo, R., A. Arias, N. Pariente, C. Perales, C. Escarmis, A. Jorge, A. Marina & E. Domingo** (2008). Molecular characterization of a dual inhibitory and mutagenic activity of 5-fluorouridine triphosphate on viral RNA synthesis. Implications for lethal mutagenesis. *J Mol Biol* **382**(3), 652-66.
- Ahmed, R., C. S. Hahn, T. Somasundaram, L. Villarete, M. Matloubian & J. H. Strauss** (1991). Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J Virol* **65**(8), 4242-7.
- Ahmed, R. & M. B. Oldstone** (1988). Organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J. Exp. Med.* **167**(5), 1719-24.
- Airaksinen, A., N. Pariente, L. Menendez-Arias & E. Domingo** (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**(2), 339-49.
- Amero, C. D., J. J. Arnold, I. M. Moustafa, C. E. Cameron & M. P. Foster** (2008). Identification of the oriI-binding site of poliovirus 3C protein by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Virol* **82**(9), 4363-70.
- Arezi, B., W. Xing, J. A. Sorge & H. H. Hogrefe** (2003). Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Anal Biochem* **321**(2), 226-35.
- Arias, A., R. Agudo, C. Ferrer-Orta, R. Perez-Luque, A. Airaksinen, E. Brocchi, E. Domingo, N. Verdaguer & C. Escarmis** (2005). Mutant viral polymerase in the transition of virus to error catastrophe identifies a critical site for RNA binding. *J Mol Biol* **353**(5), 1021-32.
- Arias, A., J. J. Arnold, M. Sierra, E. D. Smidansky, E. Domingo & C. E. Cameron** (2008). Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* **82**(24), 12346-55.
- Arias, A., C. M. Ruiz-Jarabo, C. Escarmis & E. Domingo** (2004). Fitness increase of memory genomes in a viral quasispecies. *J Mol Biol* **339**(2), 405-12.
- Arien, K. K., Y. Gali, A. El-Abdellati, L. Heyndrickx, W. Janssens & G. Vanham** (2006). Replicative fitness of CCR5-using and CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 biological clones. *Virology* **347**(1), 65-74.
- Arnold, J. J., M. Vignuzzi, J. K. Stone, R. Andino & C. E. Cameron** (2005). Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **280**(27), 25706-16.
- Asahina, Y., N. Izumi, N. Enomoto, M. Uchihara, M. Kurosaki, Y. Onuki, Y. Nishimura, K. Ueda, K. Tsuchiya, H. Nakanishi, T. Kitamura & S. Miyake** (2005). Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **43**(4), 623-9.

- Bae, Y. S. & J. W. Yoon** (1993). Determination of diabetogenicity attributable to a single amino acid, Ala776, on the polyprotein of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* **42**(3), 435-43.
- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo & E. Domingo** (2001a). Evolution of cell recognition by viruses. *Science* **292**(5519), 1102-5.
- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, F. Lim & E. Domingo** (2001b). Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain. *Virology* **288**(2), 192-202.
- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, N. Pariente, N. Verdaguer & E. Domingo** (2003). Evolution of cell recognition by viruses: a source of biological novelty with medical implications. *Adv Virus Res* **62**(19-111).
- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, N. Sevilla, D. Andreu, E. Beck & E. Domingo** (2000). Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* **74**(4), 1641-7.
- Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguer, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck & E. Domingo** (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**(8), 6362-72.
- Batschelet, E., E. Domingo & C. Weissmann** (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* **1**(1), 27-32.
- Beard, C. W. & P. W. Mason** (2000). Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**(2), 987-91.
- Belsham, G. J.** (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **60**(3), 241-260.
- Belsham, G. J. & E. Martínez-Salas** (2004). Genome organization, translation and replication of foot-and-mouth disease virus RNA. In: *Foot-and-mouth disease: current perspectives* (F. Sobrino & E. Domingo, Eds.), pp. 19-52. Horizon Bioscience, Wymondham, England.
- Belsham, G. J., G. M. McInerney & N. Ross-Smith** (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* **74**(1), 272-80.
- Belsham, G. J. & P. Normann** (2008). Dynamics of picornavirus RNA replication within infected cells. *J Gen Virol* **89**(Pt 2), 485-93.
- Berinstein, A., M. Roivainen, T. Hovi, P. W. Mason & B. Baxt** (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v \beta_3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J Virol* **69**(4), 2664-2666.
- Bienz, K., D. Egger, M. Troxler & L. Pasamontes** (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**(3), 1156-63.
- Bjorndal, A., H. Deng, M. Jansson, J. R. Fiore, C. Colognesi, A. Karlsson, J. Albert, G. Scarlatti, D. R. Littman & E. M. Fenyo** (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **71**(10), 7478-87.
- Borrego, B., I. S. Novella, E. Giralt, D. Andreu & E. Domingo** (1993). Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J Virol* **67**(10), 6071-6079.
- Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Pfeffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. Oldstone & G. M. Shaw** (1997). Antiviral

- pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine* **3**(2), 205-211.
- Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco & F. A. Rey** (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(23), 13034-9.
- Brown, C. C.** (2004). Stepping stones in foot-and-mouth disease research: a personal view. Wymondham, England, Horizon Bioscience.
- Buenz, E. J. & C. L. Howe** (2006). Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol* **14**(1), 28-36.
- Cao, W., M. D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J. H. Elder, E. V. Ravkov, S. T. Nichol, R. W. Compans, K. P. Campbell & M. B. Oldstone** (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**(5396), 2079-81.
- Cao, X., I. E. Bergmann, R. Fullkrug & E. Beck** (1995). Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **69**(1), 560-3.
- Carman, W. F., A. R. Zanetti, P. Karayiannis, J. Waters, G. Manzillo, E. Tanzi, A. J. Zuckerman & H. C. Thomas** (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* **336**(8711), 325-9.
- Carrillo, C., Z. Lu, M. V. Borca, A. Vagnozzi, G. F. Kutish & D. L. Rock** (2007). Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J Virol* **81**(20), 11341-51.
- Carrillo, C., E. R. Tulman, G. Delhon, Z. Lu, A. Carreno, A. Vagnozzi, G. F. Kutish & D. L. Rock** (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**(10), 6487-504.
- Cencic, R., C. Mayer, M. A. Juliano, L. Juliano, R. Konrat, G. Kontaxis & T. Skern** (2007). Investigating the substrate specificity and oligomerisation of the leader protease of foot and mouth disease virus using NMR. *J Mol Biol* **373**(4), 1071-87.
- Clarke, D. K., E. A. Duarte, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo & J. Holland** (1993). Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. *J Virol* **67**(1), 222-228.
- Coffin, J. M.** (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**(5197), 483-489.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes & H. E. Varmus** (1997). Retroviruses. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cooper, A. C., N. C. Banasiak & P. J. Allen** (2003). Management and prevention strategies for respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infants and young children: a review of evidence-based practice interventions. *Pediatr Nurs* **29**(6), 452-6.
- Cooper, V. S., M. H. Reiskind, J. A. Miller, K. A. Shelton, B. A. Walther, J. S. Elkinton & P. W. Ewald** (2002). Timing of transmission and the evolution of virulence of an insect virus. *Proc Biol Sci* **269**(1496), 1161-5.
- Crance, J. M., N. Scaramozzino, A. Jouan & D. Garin** (2003). Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* **58**(1), 73-9.
- Crotty, S., C. Cameron & R. Andino** (2002). Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J Mol Med* **80**(2), 86-95.

- Crotty, S., C. E. Cameron & R. Andino** (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(12), 6895-900.
- Crotty, S., D. Maag, J. J. Arnold, W. Zhong, J. Y. N. Lau, Z. Hong, R. Andino & C. E. Cameron** (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* **6**(1375-1379).
- Cummings, K. J., S. M. Lee, E. S. West, J. Cid-Ruzafa, S. G. Fein, Y. Aoki, M. S. Sulkowski & S. N. Goodman** (2001). Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: A meta-analysis of randomized trials. *Jama* **285**(2), 193-9.
- Chao, L.** (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**(6300), 454-455.
- Cherkasova, E. A., M. L. Yakovenko, G. V. Rezapkin, E. A. Korotkova, O. E. Ivanova, T. P. Eremeeva, L. I. Krasnoproshina, N. I. Romanenkova, N. R. Rozaeva, L. Sirota, V. I. Agol & K. M. Chumakov** (2005). Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine. *J Virol* **79**(2), 1062-70.
- Chevaliez, S., R. Brillet, E. Lazaro, C. Hezode & J. M. Pawlotsky** (2007). Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol* **81**(14), 7732-41.
- Chumakov, K. M., L. B. Powers, K. E. Noonan, I. B. Roninson & I. S. Levenbook** (1991). Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(1), 199-203.
- Davis, G. L., R. Esteban-Mur, V. Rustgi, J. Hoefs, S. C. Gordon, C. Trepo, M. L. Shiffman, S. Zeuzem, A. Craxi, M. H. Ling & J. Albrecht** (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**(21), 1493-9.
- de Felipe, P., L. E. Hughes, M. D. Ryan & J. D. Brown** (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* **278**(13), 11441-8.
- de Felipe, P. & M. D. Ryan** (2004). Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. *Traffic* **5**(8), 616-26.
- De Jong, J. J., A. De Ronde, W. Keulen, M. Tersmette & J. Goudsmit** (1992). Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* **66**(11), 6777-80.
- de la Torre, J. C. & J. J. Holland** (1990). RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol* **64**(12), 6278-81.
- de la Torre, J. C., E. Martinez-Salas, J. Diez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Davila & E. Domingo** (1988a). Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**(6), 2050-8.
- de la Torre, J. C., E. Martínez-Salas, J. Diez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Dávila & E. Domingo** (1988b). Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**(6), 2050-2058.
- de Los Santos, T., S. de Avila Botton, R. Weiblen & M. J. Grubman** (2006). The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol* **80**(4), 1906-14.

- de Los Santos, T., F. Diaz-San Segundo & M. J. Grubman** (2007). Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J Virol* **81**(23), 12803-15.
- De Palma, A. M., W. Heggermont, K. Lanke, B. Coutard, M. Bergmann, A. M. Monforte, B. Canard, E. De Clercq, A. Chimirri, G. Purstinger, J. Rohayem, F. van Kuppeveld & J. Neyts** (2008). The thiazolobenzimidazole TBZE-029 inhibits enterovirus replication by targeting a short region immediately downstream from motif C in the nonstructural protein 2C. *J Virol* **82**(10), 4720-30.
- Devaney, M. A., V. N. Vakharia, R. E. Lloyd, E. Ehrenfeld & M. J. Grubman** (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J Virol* **62**(11), 4407-9.
- Dever, T. E., M. J. Glynias & W. C. Merrick** (1987). GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(7), 1814-8.
- Di Bisceglie, A. M., J. Thompson, N. Smith-Wilkaitis, E. M. Brunt & B. R. Bacon** (2001). Combination of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: re-treatment of nonresponders to interferon. *Hepatology* **33**(3), 704-7.
- Doedens, J. R. & K. Kirkegaard** (1995). Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *Embo J* **14**(5), 894-907.
- Domingo, E.** (1989). RNA virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res* **33**(93-133).
- Domingo, E., Ed.** (2006). Quasispecies: Concepts and Implications for Virology. Current Topics in Microbiology and Immunology. .
- Domingo, E.** (2007). Virus Evolution. In: *Fields Virology*. (D. M. Knipe & P. M. Howley, Eds.), pp. 389-421. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Domingo, E., C. Biebricher, M. Eigen & J. J. Holland** (2001). Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. Austin, TX, Landes Bioscience.
- Domingo, E., M. Davila & J. Ortin** (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**(3-4), 333-46.
- Domingo, E., editor** (2005). Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res.* **107**(115-228).
- Domingo, E. & J. J. Holland** (1992). Complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. *Genet. Eng. (N Y)* **14**(13-31).
- Domingo, E. & J. J. Holland** (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**(151-178).
- Domingo, E., V. Martin, C. Perales, A. Grande-Perez, J. Garcia-Arriaza & A. Arias** (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **299**(51-82).
- Domingo, E., L. Menendez-Arias, M. E. Quinones-Mateu, A. Holguin, M. Gutierrez-Rivas, M. A. Martinez, J. Quer, I. S. Novella & J. J. Holland** (1997). Viral quasispecies and the problem of vaccine-escape and drug-resistant mutants. *Prog Drug Res* **48**(99-128).
- Domingo, E., C. M. Ruiz-Jarabo, A. Arias, J. F. Garcia-Arriaza & C. Escarmís** (2004). Quasispecies dynamics and evolution of foot-and-mouth disease virus. In: *Foot-and-Mouth Disease* (F. Sobrino & E. Domingo, Eds.), pp. Horizon Bioscience, Wymondham, England.

- Domingo, E., C. M. Ruíz-Jarabo, A. Arias, C. Molina-Paris, C. Briones, E. Baranowski & C. Escarmís** (2003). Detection and biological implications of genetic memory in viral quasispecies. In: *Cardiomyopathies and Heart Failure: Biomolecular, Infectious and Immune Mechanisms* (A. Matsumori, Eds.), pp. 259-276. Kluwer Academic Publishers, London, UK.
- Domingo, E., D. Sabo, T. Taniguchi & C. Weissmann** (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**(4), 735-744.
- Drake, J. W.** (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(16), 7160-7164.
- Drake, J. W.** (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(9), 4171-5.
- Drake, J. W. & J. J. Holland** (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(13), 13910-13913.
- Duarte, E., D. Clarke, A. Moya, E. Domingo & J. Holland** (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(13), 6015-6019.
- Duarte, E. A., D. K. Clarke, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo & J. Holland** (1993). Many-trillionfold amplification of single RNA virus particles fails to overcome the Muller's ratchet effect. *J Virol* **67**(6), 3620-3623.
- Duarte, E. A., I. S. Novella, S. Ledesma, D. K. Clarke, A. Moya, S. F. Elena, E. Domingo & J. J. Holland** (1994a). Subclonal components of consensus fitness in an RNA virus clone. *J Virol* **68**(7), 4295-4301.
- Duarte, E. A., I. S. Novella, S. C. Weaver, E. Domingo, S. Wain-Hobson, D. K. Clarke, A. Moya, S. F. Elena, J. C. de la Torre & J. J. Holland** (1994b). RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect. Agents Dis.* **3**(4), 201-214.
- Dulbecco, R. & G. Freeman** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**(3), 396-7.
- Ebihara, H., A. Takada, D. Kobasa, S. Jones, G. Neumann, S. Theriault, M. Bray, H. Feldmann & Y. Kawaoka** (2006). Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice. *PLoS Pathog* **2**(7), e73.
- Echols, H. & M. F. Goodman** (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* **60**(477-511).
- Edell, D., E. Bruce, K. Hale, D. Edell & V. Khoshoo** (1998). Reduced long-term respiratory morbidity after treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis with ribavirin in previously healthy infants: a preliminary report. *Pediatr Pulmonol* **25**(3), 154-8.
- Eigen, M.** (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**(465-523).
- Eigen, M.** (2002). Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(21), 13374-6.
- Eigen, M. & C. K. Biebricher** (1988). Sequence space and quasispecies distribution. In: *RNA Genetics* (E. Domingo, P. Ahlquist & J. J. Holland, Eds.), **3**, pp. 211-245. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Eigen, M. & P. Schuster** (1979). The hypercycle. A principle of natural self-organization. Berlin, Springer.
- Emerson, S. U., Y. K. Huang, H. Nguyen, A. Brockington, S. Govindarajan, M. St Claire, M. Shapiro & R. H. Purcell** (2002). Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C. *J Virol* **76**(17), 8551-9.

- Escarmis, C., M. Davila, N. Charpentier, A. Bracho, A. Moya & E. Domingo** (1996). Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**(2), 255-67.
- Escarmis, C., M. Davila & E. Domingo** (1999). Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J Mol Biol* **285**(2), 495-505.
- Escarmis, C., J. Dopazo, M. Davila, E. L. Palma & E. Domingo** (1995). Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res* **35**(2), 155-67.
- Escarmis, C., G. Gomez-Mariano, M. Davila, E. Lazaro & E. Domingo** (2002). Resistance to extinction of low fitness virus subjected to plaque-to-plaque transfers: diversification by mutation clustering. *J Mol Biol* **315**(4), 647-61.
- Escarmis, C., E. Lazaro, A. Arias & E. Domingo** (2008). Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction. *J Mol Biol* **376**(2), 367-79.
- Escarmis, C., E. Lazaro & S. C. Manrubia** (2006). Population bottlenecks in quasispecies dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**(141-70).
- Escarmis, C., M. Toja, M. Medina & E. Domingo** (1992). Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**(2), 113-25.
- Escriu, F., A. Fraile & F. Garcia-Arenal** (2003). The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution* **57**(4), 755-65.
- Feng, D. F., M. S. Johnson & R. F. Doolittle** (1984). Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *J. Mol. Evol.* **21**(2), 112-25.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Agudo, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo & N. Verdaguier** (2006a). The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J* **25**(4), 880-8.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis & N. Verdaguier** (2006b). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**(1), 27-34.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo & N. Verdaguier** (2004). Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J. Biol. Chem.* **279**(45), 47212-21.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, R. Perez-Luque, C. Escarmis, E. Domingo & N. Verdaguier** (2007). Sequential structures provide insights into the fidelity of RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22), 9463-8.
- Figlerowicz, M., M. Alejska, A. Kurzynska-Kokorniak & M. Figlerowicz** (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Medicinal Res. Reviews* **23**(4), 488-518.
- Flint, S. J., L. W. Enquist, V. R. Racaniello & A. M. Skalka** (2009). Principles of Virology. Washington, D.C., ASM Press.
- Frank, S. A.** (1996). The design of natural and artificial adaptive systems. In: *Adaptation* (M. R. Rose & G. V. Lauder, Eds.), pp. 451-505. Academic Press, San Diego.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz & T. Ellenberger** (2006). DNA repair and mutagenesis. Washington, DC, American Society for Microbiology.
- Frings, W. & A. Dotzauer** (2001). Adaptation of primate cell-adapted hepatitis A virus strain HM175 to growth in guinea pig cells is independent of mutations in the 5' nontranslated region. *J Gen Virol* **82**(Pt 3), 597-602.

- Frolov, I., R. Hardy & C. M. Rice** (2001). Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *Rna* **7**(11), 1638-51.
- Fujii, H., K. Moriyama, N. Sakamoto, T. Kondo, K. Yasuda, Y. Hiraizumi, M. Yamazaki, Y. Sakaki, K. Okochi & E. Nakajima** (1992). Gly145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun* **184**(3), 1152-7.
- Gallois-Montbrun, S., Y. Chen, H. Dutartre, M. Sophys, S. Morera, C. Guerreiro, B. Schneider, L. Mulard, J. Janin, M. Veron, D. Deville-Bonne & B. Canard** (2003). Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by NDP kinase: comparison with other ribavirin targets. *Mol Pharmacol* **63**(3), 538-46.
- Garcia-Arriaza, J., E. Domingo & C. Escarmis** (2005). A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: a link between interference and competitive fitness. *Virology* **335**(2), 155-64.
- Garcia-Arriaza, J., S. C. Manrubia, M. Toja, E. Domingo & C. Escarmis** (2004). Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* **78**(21), 11678-85.
- Ge, L., J. Zhang, X. Zhou & H. Li** (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *J Virol* **81**(11), 5902-7.
- Gebauer, F., J. C. de la Torre, I. Gomes, M. G. Mateu, H. Barahona, B. Tiraboschi, I. Bergmann, P. A. de Mello & E. Domingo** (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol* **62**(6), 2041-2049.
- Gell-Mann, M.** (1994). Complex adaptive systems. In: *Complexity. Metaphors, models and reality* (G. A. Cowan, D. Pines & D. Meltzer, Eds.), pp. 17-45. Wesley Publishing Co., Reading, MA.
- Giraud, A. T., E. Beck, K. Strebel, P. A. de Mello, J. L. La Torre, E. A. Scodeller & I. E. Bergmann** (1990). Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains. *Virology* **177**(2), 780-3.
- Gmyl, A. P., S. A. Korshenko, E. V. Belousov, E. V. Khitrina & V. I. Agol** (2003). Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces? *RNA* **9**(10), 1221-31.
- Gonzalez-Lopez, C., A. Arias, N. Pariente, G. Gomez-Mariano & E. Domingo** (2004). Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J Virol* **78**(7), 3319-24.
- Gonzalez-Lopez, C., G. Gomez-Mariano, C. Escarmis & E. Domingo** (2005). Invariant aphthovirus consensus nucleotide sequence in the transition to error catastrophe. *Infect Genet Evol* **5**(4), 366-74.
- Gorbalenya, A. E. & E. V. Koonin** (1989). Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Res* **17**(21), 8413-40.
- Graff, J., A. Normann, S. M. Feinstone & B. Flehmig** (1994). Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants. *J Virol* **68**(1), 548-54.
- Grande-Perez, A., G. Gomez-Mariano, P. R. Lowenstein & E. Domingo** (2005a). Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J Virol* **79**(16), 10451-9.
- Grande-Perez, A., E. Lazaro, P. Lowenstein, E. Domingo & S. C. Manrubia** (2005b). Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(12), 4448-52.

- Grande-Perez, A., S. Sierra, M. G. Castro, E. Domingo & P. R. Lowenstein** (2002). Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20), 12938-43.
- Grande-Pérez, A., S. Sierra, M. G. Castro, E. Domingo & P. R. Lowenstein** (2002). Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(20), 12938-43.
- Gromeier, M., E. Wimmer & A. E. Gorbalenya** (1999). Genetics, pathogenesis and evolution of picornaviruses. In: *Origin and Evolution of Viruses* (E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland, Eds.), pp. 287-343. Academic Press, San Diego.
- Grubman, M. J., M. P. Moraes, F. Diaz-San Segundo, L. Pena & T. de los Santos** (2008). Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**(1), 8-17.
- Guarne, A., J. Tormo, R. Kirchweger, D. Pfistermueller, I. Fita & T. Skern** (1998). Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain- like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *Embo J* **17**(24), 7469-79.
- Hahn, C. S., S. Lustig, E. G. Strauss & J. H. Strauss** (1988). Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(16), 5997-6001.
- Hall, C. B., J. T. McBride, E. E. Walsh, D. M. Bell, C. L. Gala, S. Hildreth, L. G. Ten Eyck & W. J. Hall** (1983). Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. A randomized double-blind study. *N Engl J Med* **308**(24), 1443-7.
- Hansen, J., A. M. Long & S. Schultz** (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **15**(1109-1122).
- Harris, J. R. & V. R. Racaniello** (2003). Changes in rhinovirus protein 2C allow efficient replication in mouse cells. *J Virol* **77**(8), 4773-80.
- Harris, J. R. & V. R. Racaniello** (2005). Amino acid changes in proteins 2B and 3A mediate rhinovirus type 39 growth in mouse cells. *J Virol* **79**(9), 5363-73.
- Herrera, M., J. Garcia-Arriaza, N. Pariente, C. Escarmis & E. Domingo** (2007). Molecular basis for a lack of correlation between viral fitness and cell killing capacity. *PLoS Pathog* **3**(4), e53.
- Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard & M. Markowitz** (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**(6510), 123-6.
- Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol & S. VandePol** (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**(4540), 1577-85.
- Holland, J. J., J. C. de la Torre, D. K. Clarke & E. Duarte** (1991). Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J Virol* **65**(6), 2960-2967.
- Holland, J. J., E. Domingo, J. C. de la Torre & D. A. Steinhauer** (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J Virol* **64**(3960-3962).
- Hsu, E. C., F. Sarangi, C. Iorio, M. S. Sidhu, S. A. Udem, D. L. Dillehay, W. Xu, P. A. Rota, W. J. Bellini & C. D. Richardson** (1998). A single amino acid change

- in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J Virol* **72**(4), 2905-16.
- Hu, N. Z., Y. Z. Hu, H. J. Shi, G. D. Liu & S. Qu** (2002). Mutational characteristics in consecutive passage of rapidly replicating variants of hepatitis A virus strain H2 during cell culture adaptation. *World J Gastroenterol* **8**(5), 872-8.
- Hultgren, C., D. R. Milich, O. Weiland & M. Sallberg** (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the T helper (Th) 1/Th2 subset balance in hepatitis B and C virus-specific immune responses. *J Gen Virol* **79** (Pt 10)(2381-91.
- Isnard, M., M. Granier, R. Frutos, B. Reynaud & M. Peterschmitt** (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* **79**(3091-9.
- Jackson, T., F. M. Ellard, R. A. Ghazaleh, S. M. Brookes, W. E. Blakemore, A. H. Corteyn, D. I. Stuart, J. W. Newman & A. M. King** (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **70**(8), 5282-7.
- Jackson, T., A. P. Mould, D. Sheppard & A. M. King** (2002). Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**(3), 935-41.
- Jackson, T., D. Sheppard, M. Denyer, W. Blakemore & A. M. King** (2000). The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **74**(11), 4949-56.
- Jerzak, G. V., K. Bernard, L. D. Kramer, P. Y. Shi & G. D. Ebel** (2007). The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. *Virology* **360**(2), 469-76.
- Jerzak, G. V., I. Brown, P. Y. Shi, L. D. Kramer & G. D. Ebel** (2008). Genetic diversity and purifying selection in West Nile virus populations are maintained during host switching. *Virology* **374**(2), 256-60.
- King, A. M. Q.** (1988). Genetic recombination in positive strand RNA viruses. In: *RNA Genetics* (E. Domingo, J. J. Holland & P. Ahlquist, Eds.), **II**, pp. CRC Press Inc., Boca Raton Fl.
- Klein, M., H. J. Eggers & B. Nelsen-Salz** (1999). Echovirus 9 strain barty non-structural protein 2C has NTPase activity. *Virus Res* **65**(2), 155-60.
- Knowles, N. J. & A. R. Samuel** (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* **91**(1), 65-80.
- Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice & T. A. Steitz** (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**(5065), 1783-90.
- Kunkel, T. A. & P. S. Alexander** (1986). The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *J Biol Chem* **261**(1), 160-6.
- Lázaro, E., C. Escarmís, E. Domingo & S. C. Manrubia** (2002). Modeling viral genome fitness evolution associated with serial bottleneck events: evidence of stationary states of fitness. *J Virol* **76**(17), 8675-81.
- Lazaro, E., C. Escarmis, J. Perez-Mercader, S. C. Manrubia & E. Domingo** (2003). Resistance of virus to extinction on bottleneck passages: Study of a decaying and fluctuating pattern of fitness loss. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(19), 10830-10835.
- Lea, S., J. Hernandez, W. Blakemore, E. Brocchi, S. Curry, E. Domingo, E. Fry, R. Abu-Ghazaleh, A. King, J. Newman & et al.** (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**(2), 123-39.

- Li, J. P. & D. Baltimore** (1990). An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating defect. *J Virol* **64**(3), 1102-7.
- Loeb, L. A., J. M. Essigmann, F. Kazazi, J. Zhang, K. D. Rose & J. I. Mullins** (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(1492-1497).
- Loeffler, F. & P. Frosch** (1898). Berichte der kommission zur erforschung der maul-und klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* **23**(371-391).
- Lopez-Bueno, A., M. P. Rubio, N. Bryant, R. McKenna, M. Agbandje-McKenna & J. M. Almendral** (2006). Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* **80**(3), 1563-73.
- Lopez-Bueno, A., J. C. Segovia, J. A. Bueren, M. G. O'Sullivan, F. Wang, P. Tattersall & J. M. Almendral** (2008). Evolution to pathogenicity of the parvovirus minute virus of mice in immunodeficient mice involves genetic heterogeneity at the capsid domain that determines tropism. *J Virol* **82**(3), 1195-203.
- López-Bueno, A., L. P. Villarreal & J. M. Almendral** (2006). Parvovirus variation for disease: A difference with RNA viruses? In: *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* Eds.), **299**, pp. 349-370.
- Lyle, J. M., E. Bullitt, K. Bienz & K. Kirkegaard** (2002). Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**(5576), 2218-22.
- Maag, D., C. Castro, Z. Hong & C. E. Cameron** (2001). Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* **276**(49), 46094-8.
- Mangia, A., R. Santoro, N. Minerva, G. L. Ricci, V. Carretta, M. Persico, F. Vinelli, G. Scotto, D. Bacca, M. Annese, M. Romano, F. Zechini, F. Sogari, F. Spirito & A. Andriulli** (2005). Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* **352**(25), 2609-17.
- Marks, H., J. J. van Duijse, D. Zuidema, M. C. van Hulten & J. M. Vlak** (2005). Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus isolate from shrimp. *Virus Res.* **110**(1-2), 9-20.
- Martínez-Salas, E., R. Ramos, E. Lafuente & S. López de Quinto** (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J. Gen. Virol.* **82**(Pt 5), 973-84.
- Martinez-Salas, E., J. C. Saiz, M. Davila, G. J. Belsham & E. Domingo** (1993). A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol* **67**(7), 3748-55.
- Martinez, M. A., C. Carrillo, F. Gonzalez-Candelas, A. Moya, E. Domingo & F. Sobrino** (1991). Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J Virol* **65**(7), 3954-7.
- Mason, P. W., S. V. Bezborodova & T. M. Henry** (2002). Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**(19), 9686-94.
- Mateu, M. G.** (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.* **38**(1), 1-24.

- Mateu, M. G., J. L. Da Silva, E. Rocha, D. L. De Brum, A. Alonso, L. Enjuanes, E. Domingo & H. Barahona** (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* **167**(1), 113-124.
- Mateu, M. G., J. Hernandez, M. A. Martinez, D. Feigelstock, S. Lea, J. J. Perez, E. Giralt, D. Stuart, E. L. Palma & E. Domingo** (1994). Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J Virol* **68**(3), 1407-17.
- Mateu, M. G., M. A. Martinez, L. Capucci, D. Andreu, E. Giralt, F. Sobrino, E. Brocchi & E. Domingo** (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71** (Pt 3)(629-37.
- Mateu, M. G., M. A. Martinez, E. Rocha, D. Andreu, J. Parejo, E. Giralt, F. Sobrino & E. Domingo** (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15), 5883-7.
- Matloubian, M., S. R. Kolhekar, T. Somasundaram & R. Ahmed** (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **67**(12), 7340-9.
- McCormick, J. B., I. J. King, P. A. Webb, C. L. Scribner, R. B. Craven, K. M. Johnson, L. H. Elliott & R. Belmont-Williams** (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* **314**(1), 20-6.
- Medina, M., E. Domingo, J. K. Brangwyn & G. J. Belsham** (1993). The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* **194**(1), 355-359.
- Medina, R. A., K. Mirowsky-Garcia, J. Hutt & B. Hjelle** (2007). Ribavirin, human convalescent plasma and anti-beta3 integrin antibody inhibit infection by Sin Nombre virus in the deer mouse model. *J Gen Virol* **88**(Pt 2), 493-505.
- Mirzayan, C. & E. Wimmer** (1994). Biochemical studies on poliovirus polypeptide 2C: evidence for ATPase activity. *Virology* **199**(1), 176-87.
- Moffat, K., C. Knox, G. Howell, S. J. Clark, H. Yang, G. J. Belsham, M. Ryan & T. Wileman** (2007). Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol* **81**(3), 1129-39.
- Mohapatra, J. K., A. Sanyal, D. Hemadri, C. Tosh, S. Biswas, N. J. Knowles, T. J. Rasool, S. K. Bandyopadhyay & B. Pattnaik** (2008). Comparative genomics of serotype Asia 1 foot-and-mouth disease virus isolates from India sampled over the last two decades. *Virus Res* **136**(1-2), 16-29.
- Morace, G., G. Pisani, F. Beneduce, M. Divizia & A. Pana** (1993). Mutations in the 3A genomic region of two cytopathic strains of hepatitis A virus isolated in Italy. *Virus Res.* **28**(2), 187-94.
- Moreau, I., J. Levis, O. Crosbie, E. Kenny-Walsh & L. J. Fanning** (2008). Correlation between pre-treatment quasispecies complexity and treatment outcome in chronic HCV genotype 3a. *Virol J* **5**(78).
- Morgenstern, B., M. Michaelis, P. C. Baer, H. W. Doerr & J. Cinatl, Jr.** (2005). Ribavirin and interferon-beta synergistically inhibit SARS-associated coronavirus replication in animal and human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **326**(4), 905-8.
- Morse, S. S., Ed.** (1994). *The Evolutionary Biology of Viruses*. Raven Press, New York.

- Muller, H. J.** (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mut. Res.* **1**(2-9).
- Murphy, F. A.** (1994). New, emerging, and reemerging infectious diseases. *Adv. Virus Res.* **43**(1-52).
- Murray, K. E. & D. J. Barton** (2003). Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **77**(8), 4739-50.
- Nayak, A., I. G. Goodfellow & G. J. Belsham** (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* **79**(12), 7698-706.
- Nayak, A., I. G. Goodfellow, K. E. Woolaway, J. Birtley, S. Curry & G. J. Belsham** (2006). Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* **80**(19), 9865-75.
- Neumann, A. U., N. P. Lam, H. Dahari, D. R. Gretch, T. E. Wiley, T. J. Layden & A. S. Perelson** (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**(5386), 103-7.
- Nichol, S. T., C. F. Spiropoulou, S. Morzunov, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, H. Feldmann, A. Sanchez, J. Childs, S. Zaki & C. J. Peters** (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* **262**(5135), 914-7.
- Ning, Q., D. Brown, J. Parodo, M. Catral, R. Gorczynski, E. Cole, L. Fung, J. W. Ding, M. F. Liu, O. Rotstein, M. J. Phillips & G. Levy** (1998). Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* **160**(7), 3487-93.
- Novella, I. S., E. A. Duarte, S. F. Elena, A. Moya, E. Domingo & J. J. Holland** (1995). Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(13), 5841-5844.
- Novella, I. S., R. N. Dutta & C. O. Wilke** (2008). A linear relationship between fitness and the logarithm of the critical bottleneck size in vesicular stomatitis virus populations. *J Virol* **82**(24), 12589-90.
- Novella, I. S. & B. E. Ebendick-Corpus** (2004). Molecular basis of fitness loss and fitness recovery in vesicular stomatitis virus. *J Mol Biol* **342**(5), 1423-30.
- Novella, I. S., D. D. Reissig & C. O. Wilke** (2004). Density-dependent selection in vesicular stomatitis virus. *J Virol* **78**(11), 5799-804.
- Núñez, J. I., E. Baranowski, N. Molina, C. M. Ruiz-Jarabo, C. Sanchez, E. Domingo & F. Sobrino** (2001). A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J Virol* **75**(8), 3977-83.
- O'Donnell, V. K., J. M. Pacheco, T. M. Henry & P. W. Mason** (2001). Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A. *Virology* **287**(1), 151-62.
- Ojosnegros, S.** (2009). Dinámica evolutiva de virus RNA. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain.
- Pacheco, J. M., T. M. Henry, V. K. O'Donnell, J. B. Gregory & P. W. Mason** (2003). Role of nonstructural proteins 3A and 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **77**(24), 13017-27.

- Page, T. & J. D. Connor** (1990). The metabolism of ribavirin in erythrocytes and nucleated cells. *Int J Biochem* **22**(4), 379-83.
- Pariente, N., A. Airaksinen & E. Domingo** (2003). Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **77**(12), 7131-8.
- Pariente, N., S. Sierra & A. Airaksinen** (2005). Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* **107**(2), 183-193.
- Pariente, N., S. Sierra, P. R. Lowenstein & E. Domingo** (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J Virol* **75**(20), 9723-30.
- Parker, W. B.** (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* **107**(2), 165-71.
- Paul, A. V.** (2002). Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication. In: *Molecular Biology of Picornaviruses* (B. L. Semler & E. Wimmer, Eds.), pp. 227-246. ASM Press, Washington, DC.
- Paul, A. V., J. Peters, J. Mugavero, J. Yin, J. H. van Boom & E. Wimmer** (2003). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J Virol* **77**(2), 891-904.
- Paul, A. V., J. H. van Boom, D. Filippov & E. Wimmer** (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**(6682), 280-4.
- Pawlotsky, J. M.** (2000). Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* **32**(5), 889-96.
- Pawlotsky, J. M., G. Germanidis, A. U. Neumann, M. Pellerin, P. O. Frainais & D. Dhumeaux** (1998). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* **72**(4), 2795-2805.
- Peavy, D. L., C. N. Powers & V. Knight** (1981). Inhibition of murine plaque-forming cell responses in vivo by ribavirin. *J Immunol* **126**(3), 861-4.
- Perales, C., R. Agudo & E. Domingo** (2009). Counteracting quasispecies adaptability: extinction of a ribavirin-resistant virus mutant by an alternative mutagenic treatment. *PLoS ONE* **4**(5), e5554.
- Perales, C., R. Mateo, M. G. Mateu & E. Domingo** (2007). Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J Mol Biol* **369**(4), 985-1000.
- Pereira, H. G.** (1981). Foot-and-mouth disease virus. In: *Virus Diseases of Food animals* (R. P. G. Gibbs, Eds.), **2**, pp. 333-363. Academic Press, New York.
- Pfeiffer, J. K. & K. Kirkegaard** (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(12), 7289-94.
- Pfeiffer, J. K. & K. Kirkegaard** (2005a). Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog* **1**(2), e11.
- Pfeiffer, J. K. & K. Kirkegaard** (2005b). Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J Virol* **79**(4), 2346-55.
- Pfeiffer, J. K. & K. Kirkegaard** (2006). Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(14), 5520-5.
- Pfister, T. & E. Wimmer** (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* **274**(11), 6992-7001.

- Piccone, M. E., E. Rieder, P. W. Mason & M. J. Grubman** (1995). The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *J Virol* **69**(9), 5376-82.
- Quiñones-Mateu, M. E. & E. Arts** (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* **299**(83-140).
- Racaniello, V. R.** (2001). *Picornaviridae: The viruses and their replication*. In: *Fields Virology* (D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, *et al.*, Eds.), pp. 685-722. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Racaniello, V. R.** (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* **344**(1), 9-16.
- Rodriguez, P. L. & L. Carrasco** (1993). Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* **268**(11), 8105-10.
- Rodriguez, P. L. & L. Carrasco** (1995). Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity. *J Biol Chem* **270**(17), 10105-12.
- Rousset, D., M. Rakoto-Andrianarivelo, R. Razafindratsimandresy, B. Randriamanalina, S. Guillot, J. Balanant, P. Mauciere & F. Delpeyroux** (2003). Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis* **9**(7), 885-7.
- Rowlands, D. J.** (1999). Foot-and-mouth disease virus (Picornaviridae). In: *Encyclopedia of Virology* (A. Granoff & R. G. Webster, Eds.), pp. Academic Press, London.
- Rowlands, D. J., Ed.** (2003). Foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**(1-161).
- Rubio, M. P., A. Lopez-Bueno & J. M. Almendral** (2005). Virulent variants emerging in mice infected with the apathogenic prototype strain of the parvovirus minute virus of mice exhibit a capsid with low avidity for a primary receptor. *J Virol* **79**(17), 11280-90.
- Ruiz-Jarabo, C. M., A. Arias, E. Baranowski, C. Escarmís & E. Domingo** (2000). Memory in viral quasispecies. *J Virol* **74**(3543-3547).
- Ruiz-Jarabo, C. M., C. Ly, E. Domingo & J. C. de la Torre** (2003). Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* **308**(1), 37-47.
- Ruiz-Jarabo, C. M., N. Pariente, E. Baranowski, M. Davila, G. Gomez-Mariano & E. Domingo** (2004). Expansion of host-cell tropism of foot-and-mouth disease virus despite replication in a constant environment. *J Gen Virol* **85**(Pt 8), 2289-97.
- Sacher, T., J. Podlech, C. A. Mohr, S. Jordan, Z. Ruzsics, M. J. Reddehase & U. H. Koszinowski** (2008). The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host. *Cell Host Microbe* **3**(4), 263-72.
- Saiz, M., S. Gomez, E. Martinez-Salas & F. Sobrino** (2001). Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**(Pt 1), 93-101.
- Salguero, F. J., M. A. Sanchez-Martin, F. Diaz-San Segundo, A. de Avila & N. Sevilla** (2005). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology* **332**(1), 384-96.
- Salt, J.** (2004). Persistence of foot-and-mouth disease virus. In: *Foot-and-mouth disease: current perspectives* (F. Sobrino & E. Domingo, Eds.), pp. 103-145. Horizon Bioscience, Wymondham, England.
- Salvato, M., P. Borrow, E. Shimomaye & M. B. Oldstone** (1991). Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic

- choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J Virol* **65**(4), 1863-9.
- Sambrook, J. & D. W. Russell** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuilova, O., C. Krogerus, I. Fabrichniy & T. Hyypia** (2006). ATP hydrolysis and AMP kinase activities of nonstructural protein 2C of human parechovirus 1. *J Virol* **80**(2), 1053-8.
- Saunders, K. & A. M. King** (1982). Guanidine-resistant mutants of aphthovirus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. *J Virol* **42**(2), 389-94.
- Saunders, K., A. M. King, D. McCahon, J. W. Newman, W. R. Slade & S. Forss** (1985). Recombination and oligonucleotide analysis of guanidine-resistant foot-and-mouth disease virus mutants. *J Virol* **56**(3), 921-9.
- Scheidel, L. M., R. K. Durbin & V. Stollar** (1987). Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. *Virology* **158**(1), 1-7.
- Schuitmaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, R. E. de Goede, R. P. van Steenwijk, J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema & M. Tersmette** (1992). Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* **66**(3), 1354-60.
- Schuster, P.** (1994). How do RNA molecules and viruses explore their worlds? In: *Complexity metaphors, models and reality* (G. A. Cowan, Pines, D., Meltzer, D., Eds.), pp. 383-414. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts.
- Schuster, P. & P. F. Stadler** (1999). Nature and evolution of early replicons. In: *Origin and Evolution of Viruses* (E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland, Eds.), pp. 1-24. Academic Press, San Diego.
- Schuster, P. & P. F. Stadler** (2008). Early Replication: Origin and Evolution. In: *Origin and Evolution of Viruses* (E. Domingo, C. Parrish & J. J. Holland, Eds.), pp. Elsevier (In press), Amsterdam, San Diego.
- Semler, B. L. & E. Wimmer**, Ed. (2002). *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, D.C.
- Serrano, P., M. R. Pulido, M. Saiz & E. Martinez-Salas** (2006). The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* **87**(Pt 10), 3013-22.
- Severson, W. E., C. S. Schmaljohn, A. Javadian & C. B. Jonsson** (2003). Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol* **77**(1), 481-8.
- Sevilla, N. & E. Domingo** (1996). Evolution of a persistent aphthovirus in cytolytic infections: partial reversion of phenotypic traits accompanied by genetic diversification. *J Virol* **70**(10), 6617-6624.
- Sevilla, N., S. Kunz, A. Holz, H. Lewicki, D. Homann, H. Yamada, K. P. Campbell, J. C. de La Torre & M. B. Oldstone** (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**(9), 1249-60.
- Sevilla, N., C. M. Ruiz-Jarabo, G. Gomez-Mariano, E. Baranowski & E. Domingo** (1998). An RNA virus can adapt to the multiplicity of infection. *J Gen Virol* **79** (Pt 12)(2971-80).
- Shapshak, P., D. M. Segal, K. A. Crandall, R. K. Fujimura, B. T. Zhang, K. Q. Xin, K. Okuda, C. K. Petito, C. Eisdorfer & K. Goodkin** (1999). Independent evolution of HIV type 1 in different brain regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(9), 811-20.

- Shiroki, K., T. Ishii, T. Aoki, Y. Ota, W. X. Yang, T. Komatsu, Y. Ami, M. Arita, S. Abe, S. Hashizume & A. Nomoto** (1997). Host range phenotype induced by mutations in the internal ribosomal entry site of poliovirus RNA. *J Virol* **71**(1), 1-8.
- Sierra, M.** (2007). Bases moleculares de la resistencia a ribavirina en el virus de la fiebre aftosa. Implicaciones para la mutagénesis letal de virus. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain.
- Sierra, M., A. Airaksinen, C. Gonzalez-Lopez, R. Agudo, A. Arias & E. Domingo** (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol* **81**(4), 2012-24.
- Sierra, S., M. Davila, P. R. Lowenstein & E. Domingo** (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol* **74**(18), 8316-23.
- Simmons, A., R. P. Whitehead, A. A. Kolokoltsov & R. A. Davey** (2006). Use of recombinant lentivirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein G for efficient generation of human anti-cancer chimeric T cells by transduction of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Virol J* **3**(8).
- Sitbon, M., L. d'Auriol, H. Ellerbrok, C. Andre, J. Nishio, S. Perryman, F. Pozo, S. F. Hayes, K. Wehrly, P. Tambourin & et al.** (1991). Substitution of leucine for isoleucine in a sequence highly conserved among retroviral envelope surface glycoproteins attenuates the lytic effect of the Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13), 5932-6.
- Smee, D. F., M. Bray & J. W. Huggins** (2001). Antiviral activity and mode of action studies of ribavirin and mycophenolic acid against orthopoxviruses in vitro. *Antivir Chem Chemother* **12**(6), 327-35.
- Sobrinho, F., M. Davila, J. Ortin & E. Domingo** (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**(2), 310-8.
- Sobrinho, F. & E. Domingo**, Ed. (2004). Foot-and-Mouth Disease: Current Perspectives. Horizon Bioscience. Wymondham, England.
- Steil, B. P. & D. J. Barton** (2009). Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res* **139**(2), 240-52.
- Steinhauer, D. A., E. Domingo & J. J. Holland** (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* **122**(2), 281-288.
- Stoker, M. & I. Macpherson** (1964). Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and Its Derivatives. *Nature* **203**(1355-7).
- Sutmoller, P., S. S. Barteling, R. C. Olascoaga & K. J. Sumption** (2003). Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**(1), 101-44.
- Swetina, J. & P. Schuster** (1982). Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys. Chem.* **16**(4), 329-345.
- Szepanski, S., H. J. Gross, R. Brossmer, H. D. Klenk & G. Herrler** (1992). A single point mutation of the influenza C virus glycoprotein (HEF) changes the viral receptor-binding activity. *Virology* **188**(1), 85-92.
- Takeda, N., R. J. Kuhn, C. F. Yang, T. Takegami & E. Wimmer** (1986). Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J Virol* **60**(1), 43-53.

- Tam, R. C., B. Pai, J. Bard, C. Lim, D. R. Averett, U. T. Phan & T. Milovanovic** (1999). Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol* **30**(3), 376-82.
- Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka & Y. Yanagi** (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**(6798), 893-7.
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, A. E. Krafft, K. E. Bijwaard & T. G. Fanning** (1997). Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* **275**(5307), 1793-6.
- Teng, M. N., M. B. Oldstone & J. C. de la Torre** (1996). Suppression of lymphocytic choriomeningitis virus--induced growth hormone deficiency syndrome by disease-negative virus variants. *Virology* **223**(1), 113-9.
- Teterina, N. L., K. M. Kean, A. E. Gorbalenya, V. I. Agol & M. Girard** (1992). Analysis of the functional significance of amino acid residues in the putative NTP-binding pattern of the poliovirus 2C protein. *J Gen Virol* **73** (Pt 8)(1977-86.
- Tiley, L., A. M. King & G. J. Belsham** (2003). The foot-and-mouth disease virus cis-acting replication element (cre) can be complemented in trans within infected cells. *J Virol* **77**(3), 2243-6.
- Toja, M.** (1997). Caracterización molecular de un virus de la fiebre aftosa y de sus derivados persistentes. Construcción de un clon infeccioso. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain.
- Toja, M., C. Escarmis & E. Domingo** (1999). Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* **64**(2), 161-71.
- Tolskaya, E. A., L. I. Romanova, M. S. Kolesnikova, A. P. Gmyl, A. E. Gorbalenya & V. I. Agol** (1994). Genetic studies on the poliovirus 2C protein, an NTPase. A plausible mechanism of guanidine effect on the 2C function and evidence for the importance of 2C oligomerization. *J Mol Biol* **236**(5), 1310-23.
- Tu, Z., N. M. Chapman, G. Hufnagel, S. Tracy, J. R. Romero, W. H. Barry, L. Zhao, K. Currey & B. Shapiro** (1995). The cardiovirulent phenotype of coxsackievirus B3 is determined at a single site in the genomic 5' nontranslated region. *J Virol* **69**(8), 4607-18.
- van't Wout, A. B., L. J. Ran, C. L. Kuiken, N. A. Kootstra, S. T. Pals & H. Schuitemaker** (1998). Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J Virol* **72**(1), 488-96.
- van Bakkum, J. G., H. S. Frenke, H. H. J. Frederiks & S. Frenkel** (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneeskd.* **84**(1159-1164.
- Van kuppeveld, F. J., W. J. Melchers, K. Kirkegaard & J. R. Doedens** (1997). Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology* **227**(1), 111-8.
- van Rij, R. P., H. Blaak, J. A. Visser, M. Brouwer, R. Rientsma, S. Broersen, A. M. de Roda Husman & H. Schuitemaker** (2000). Differential coreceptor expression allows for independent evolution of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV-1. *J Clin Invest* **106**(12), 1569.
- Vana, G. & K. M. Westover** (2008). Origin of the 1918 Spanish influenza virus: a comparative genomic analysis. *Mol Phylogenet Evol* **47**(3), 1100-10.

- Vance, L. M., N. Moscufo, M. Chow & B. A. Heinz (1997). Poliovirus 2C region functions during encapsidation of viral RNA. *J Virol* **71**(11), 8759-65.
- Verdaguer, N., I. Fita, E. Domingo & M. G. Mateu (1997). Efficient neutralization of foot-and-mouth disease virus by monovalent antibody binding. *J Virol* **71**(12), 9813-9816.
- Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron & R. Andino (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**(344-348).
- Vo, N. V., K. C. Young & M. M. C. Lai (2003). Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* **42**(35), 10462-71.
- Volkenstein, M. V. (1994). Physical approaches to biological evolution. Berlin, Springer-Verlag.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick & N. J. Gay (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**(8), 945-51.
- Wang, W. K., T. Dudek, Y. J. Zhao, H. G. Brumblay, M. Essex & T. H. Lee (1998). CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10), 5740-5.
- Weaver, S. C. (1998). Recurrent emergence of Venezuelan equine encephalomyelitis. In: *Emerging Infections* (W. M. Sheld & J. Hughes, Eds.), **I**, pp. 27-42. ASM Press, Washington DC.
- Webster, R. G. (1999). Antigenic variation in influenza viruses. In: *Origin and Evolution of Viruses* (E. Domingo, R. G. Webster & J. J. Holland, Eds.), pp. 377-390. Academic Press, San Diego.
- Weiner, A. J., H. M. Geysen, C. Christopherson, J. E. Hall, T. J. Mason, G. Saracco, F. Bonino, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford & et al. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8), 3468-72.
- Wilke, C. O., R. Foster & I. S. Novella (2006). Quasispecies in time-dependent environments. In: *Current Topics in Microbiol. Immunol.* Eds.), pp. in press.
- Wilke, C. O., D. D. Reissig & I. S. Novella (2004). Replication at periodically changing multiplicity of infection promotes stable coexistence of competing viral populations. *Evolution Int. J. Org. Evolution* **58**(4), 900-5.
- Willis, R. C., D. A. Carson & J. E. Seegmiller (1978). Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(7), 3042-4.
- Wong, J. K., C. C. Ignacio, F. Torriani, D. Havlir, N. J. Fitch & D. D. Richman (1997). In vivo compartmentalization of human immunodeficiency virus: evidence from the examination of pol sequences from autopsy tissues. *J Virol* **71**(3), 2059-71.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, W. P. Diver, M. Graham, C. Bateman, D. J. Baker & S. S. Smith (1988). RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **16**(10), 4465-82.
- Wray, S. K., R. H. Smith, B. E. Gilbert & V. Knight (1986). Effects of selenazofurin and ribavirin and their 5'-triphosphates on replicative functions of influenza A and B viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **29**(1), 67-72.

- Wyde, P. R., S. N. Chetty, A. M. Jewell, G. Boivin & P. A. Piedra** (2003). Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* **60**(1), 51-9.
- Xiang, W., A. Cuconati, D. Hope, K. Kirkegaard & E. Wimmer** (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3D pol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* **72**(6732-6741).
- Young, K. C., K. L. Lindsay, K. J. Lee, W. C. Liu, J. W. He, S. L. Milstein & M. M. Lai** (2003). Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology* **38**(4), 869-878.
- Yuste, E., C. López-Galíndez & E. Domingo** (2000). Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**(20), 9546-52.
- Yuste, E., S. Sánchez-Palomino, C. Casado, E. Domingo & C. López-Galíndez** (1999). Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol* **73**(4), 2745-2751.
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**(13), 3406-15.

9. Publicaciones

Hidden Virulence Determinants in a Viral Quasispecies In Vivo[▽]

Marta Sanz-Ramos,¹ Fayna Díaz-San Segundo,^{2†} Cristina Escarmís,¹
Esteban Domingo,^{1,3} and Noemí Sevilla^{1,2*}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain¹; Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain²; and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Madrid, Spain³

Received 17 April 2008/Accepted 2 August 2008

The characterization of virulence determinants of pathogenic agents is of utmost relevance for the design of disease control strategies. So far, two classes of virulence determinants have been characterized for viral populations: those imprinted in the nucleotide sequence of some specific genomic regions and those that depend on the complexity of the viral population as such. Here we provide evidence of a virulence determinant that depends neither on a genomic sequence nor on detectable differences in population complexity. Foot-and-mouth disease virus is lethal for C57BL/6 mice showing the highest viral load in pancreas. Virus isolated from pancreas after one passage in mice showed an attenuated phenotype, with no lethality even at the highest dose tested. By contrast, virus from sera of the same mice displayed a virulence similar to that of the parental wild-type clone and virus isolated from spleen displayed an intermediate phenotype. However, viral populations from pancreas, spleen, and serum showed indistinguishable consensus genomic nucleotide sequences and mutant spectrum complexities, as quantified according to the mutation frequencies of both entire genomic nucleotide sequences of biological clones. The results show that the populations with differing virulences cannot be distinguished either by the consensus sequence or by the average complexity of the mutant spectrum. Differential harvesting of virus generated by cell transfection of RNA from serum and pancreas failed to reveal genetic differences between subpopulations endowed with differing virulences. In addition to providing evidence of hidden virulence determinants, this study underlines the capacity of a clone of an RNA virus to rapidly diversify phenotypically in vivo.

Genetic diversity is one of the most important features that allows a population to evolve in an ever-changing environment with shifting selecting pressures. RNA viruses display the highest replication error rates scored among components of our biosphere, with an average of approximately one misincorporation per 10⁴ nucleotides copied, resulting in highly diverse replicating populations, termed viral quasispecies (19, 27). A viral quasispecies can act as a unit of selection, and its properties are influenced by the interactions among its individual components (19, 57). In a complex environment such as within an animal, the ability to generate a complex mutant spectrum may allow the viral populations to adapt and survive in the different intrahost environments, including the selective pressures generated by the host immune response (16, 39, 57). During replication and spread within an infected host, viral populations may also be subjected to frequent bottleneck events that may result in an accumulation of deleterious mutations and, consequently, in an average decrease in fitness (operation of Muller's ratchet) (3, 10, 18, 21, 22, 24, 30, 32, 38). Furthermore, the genetic diversity in a viral population, which has been termed the quasispecies cloud size, is an intrinsic property of the quasispecies that may influence the viral phe-

notype. This has been clearly evidenced by variations in viral diversity brought about by the copying fidelity of the viral polymerase, which may modulate viral virulence in vivo (39, 57). A role of the mutant spectrum in viral pathogenesis has been also evidenced for West Nile virus infections (9, 29). Knowledge of the evolutionary dynamics of viral populations in vivo is key to understanding viral pathogenesis.

In the present study, we use foot-and-mouth disease virus (FMDV), a picornavirus that causes a severe vesicular disease in livestock (5, 40), to study viral population dynamics and virulence in vivo. Most studies relating to the population dynamics of FMDV (reviewed in reference 16) have been carried out in cell culture, due in part to the difficulties of using natural hosts to characterize evolving FMDV mutant spectra. We have developed a mouse model for FMDV that mimics, at least partly, the course of infection in natural hosts and that allows several aspects of FMDV pathogenesis to be addressed (42). C57BL/6 mice are highly susceptible to FMDV infection when the virus is administered subcutaneously. Signs of disease begin at 24 h postinoculation (hpi), and within 2 or 3 days of the onset of disease, the animals die. An analysis of FMDV replication in different tissues indicated a systemic infection with virus present in all major organs (42). Mice developed microvesicles near the basal layer of the epithelium (42), an event that precedes the vesiculation which is characteristic of FMD.

In the present study we have analyzed the molecular evolution of FMDV in mice by serial passages of a biological clone of FMDV (C-S8c1 [described in reference 50]) in the mouse pancreas. We found that in one single passage, virus isolated from pancreas was attenuated for mice but displayed normal

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA-INIA, Ctra. Algete-El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain. Phone: 34 916202300. Fax: 34 91 6202247. E-mail: sevilla@inia.es.

† Present address: Plum Island Animal Disease Center, North Atlantic Area, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Greenport, NY 11944.

[▽] Published ahead of print on 20 August 2008.

growth in cell culture. By contrast, viral populations isolated from serum showed a virulence similar to that of the parental virus. Furthermore, viral populations from spleen, which is a highly perfused organ (large blood input), presented a phenotype intermediate between that of the virus isolated from pancreas and that from serum. Intriguingly, the genetic diversities of these three viral populations were identical, and no differences were found among their corresponding consensus genomic sequences; nor could differences be unveiled in RNA from sequential viral harvests of BHK-21 cells transfected with viral RNA. The data support that the observed differences in virulence could be due to a dissimilar composition in genomes within the viral populations. Therefore, we propose that viral replication in mouse organs leads to an accumulation of attenuated genomes as a consequence of the random fixation of mutations and that the most virulent genomes from several mouse tissues would spread through serum in a higher proportion. According to this model, viral pathogenesis would be modulated by the proportion of attenuated and virulent genomes and by the interactions between them.

MATERIALS AND METHODS

Mice, viruses, infections, and preparation of samples. C57BL/6 mice maintained at Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) were used for all the experiments. All mice were matched for sex and age (females, 8 to 10 weeks). Mice were inoculated subcutaneously in the left rear footpad (FP) (50 μ l) or intravenously in the caudal vein (100 μ l) with homogenized naïve tissues in phosphate-buffered saline (PBS) (negative controls) or with homogenized tissues from infected mice or FMDV from the supernatants of infected cells and examined for clinical symptoms every day. At 24 hpi, mice were bled, and some of them were sacrificed by perfusion with PBS or protease inhibitor cocktail (Sigma), as indicated by the manufacturer. Pancreas, heart, spleen, and lung from most of the euthanized mice were harvested, weighed, and homogenized using an Omni tissue homogenizer (Omni International); part of each tissue was homogenized in PBS, and part in Trizol (Invitrogen). Serum was isolated from whole blood collected from the caudal vein. A fraction of the pancreas from eight infected mice was fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2) for histological staining. All the experiments with live animals were performed under the guidelines of the European Community (86/609) and were approved by the site ethical review committee.

Viruses and cells. Procedures for infection of BHK-21 cell monolayers with FMDV in liquid medium and for plaque assays in semisolid agar medium were carried out as previously described (15, 50). FMDV C-S8c1 is a plaque-purified derivative of natural isolate C1-Sta, Pau-Spain 70, a representative of the European subtype C1 FMDV (50). Biological clones from viral populations from serum and pancreas were obtained by isolating virus from randomly chosen, well-isolated, individual virus plaques, as previously described (4, 23).

Transfection of BHK-21 cell monolayers (70% confluent, about 7×10^5 cells) with FMDV RNAs (10^9 to 10^{11} RNA molecules) or RNA transcripts (about 10^{11} RNA molecules) was carried out using Lipofectin (Invitrogen) as previously described (44). Virus derived from RNA transcripts was collected from the supernatants of transfected cells at 72 h posttransfection (95% of cells displaying cytopathology [cpe]) and was passaged twice in BHK-21 cells before its use in biological studies. RNA extraction and nucleotide sequencing were performed to ensure that the virus maintained the mutations of the initial transcript. Viruses from transfections with FMDV RNA were harvested at short times (24 to 36 h) posttransfection (about 20% of cpe) and at late times (48 to 60 h) posttransfection (100% cpe), and no passage in BHK-21 cells was performed before using them in biological studies or for nucleotide sequencing. Intracellular virus was harvested by freeze-thawing of the transfected BHK-21 cells.

Histopathology. Samples from pancreas were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2) for histopathological studies. After fixation, samples were dehydrated through a graded series of alcohol to xylol and embedded in paraffin wax. Sections 4 μ m thick were cut and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis.

RNA extraction, cDNA synthesis, PCR amplification, and nucleotide sequencing. RNA was extracted from mouse tissues by treatment with Trizol (Invitrogen) according to the instructions of the manufacturer, from the supernatants of

infected cells, or from biological clones, as previously described (48). Reverse transcription (RT) of FMDV RNA was performed using avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega) or Transcriptor reverse transcriptase (Roche), according to the manufacturer's instructions. For the determination of the consensus sequences (viral populations and biological clones), PCR amplification was carried out using the Expand high-fidelity polymerase system (Roche), as specified by the manufacturers. RT-PCR amplification of FMDV RNA from mouse tissues was performed using a 1:10 dilution of the extracted RNA. Viral RNA detection and semiquantification in samples from passage 2 mouse tissues were performed by RT-PCR amplification of two different genomic regions: residues 2767 to 4193 (spanning parts of VP3-, VP1-, 2A-, and 2B-coding regions) and residues 6308 to 7157 (spanning parts of 3C- and 3D-coding regions) (the numbering of residues of the FMDV genome is according to reference 53); amplifications were carried out in parallel with known amounts of standard C-S8c1 RNA, and the products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels. For the molecular cloning of individual viral RNA molecules and the construction of FMDV infectious plasmids containing specific mutations, PCR amplification was carried out using *PfuUltra* DNA polymerase (Stratagene), due to its high copying fidelity (12), using procedures described previously (35). The FMDV-specific primers used for these amplifications and for sequencing have been previously described (21, 22). Nucleotide sequencing was performed using the BigDye Terminator cycle sequencing kit (ABI Prism; Perkin-Elmer) and an automated ABI 373 sequencer; all sequences were determined at least twice from independent sequencing reaction mixtures.

Viral RNA quantification. FMDV RNA quantification was performed by real-time RT-PCR using the LightCycler instrument (Roche) and the RNA master SYBR green I kit (Roche) as specified by the manufacturer. Quantification was relative to a standard curve obtained with known amounts of FMDV C-S8c1 RNA and was done using a procedure that has been described previously (25, 26).

Molecular cloning. Residues 2767 to 4192 (corresponding to parts of VP3-, VP1-, 2A-, and 2B-coding regions) and residues 4027 to 6009 (spanning parts of 2B-, 2C-, 3A-, and 3B-coding regions) of the FMDV genome were amplified by RT-PCR as described above. PCR amplification was carried out with a 1:10, 1:100, and 1:1,000 dilution of template RNA by use of *PfuUltra* DNA polymerase (Stratagene) to ensure both a basal error rate in the range of 7.0×10^{-5} to 1.4×10^{-4} substitutions per nucleotide and an adequate representation of the components of the mutant spectrum among the sequences determined (2, 34, 45). Cloning was carried out with the amplification products of the 1:10 dilutions sample when both the 1:100 and 1:1,000 dilutions of template yielded a visible band (controls and procedure detailed in reference 2). Molecular clones corresponding to the VP1 genomic region (residues 2767 to 4192) were obtained by ligation of cDNA into the pGEM-T Easy vector (Promega) and transformation into *Escherichia coli* DH5 α cells. DNA from positive colonies was amplified with a TempliPhi amplification kit (Amersham) by following the manufacturer's protocol. Amplified cDNAs from the 2B-to-3B-coding region were digested with the restriction enzymes HindIII (position 4068) and EcoRI (position 5369) (New England Biolabs) and ligated to plasmid pGEM 4Z (Promega) previously digested with the same restriction enzymes and treated with shrimp alkaline phosphatase (New England Biolabs). Transformation of *E. coli* DH5 α colony screening by PCR amplification, and nucleotide sequencing of individual clones were carried out as previously described (2, 44). The genomic region sequenced corresponded to the entire VP1-coding region and residues 4072 to 5366 (spanning part of 2B, the complete 2C, and part of 3A). Seventy-four or 75 independently cloned viruses were sequenced from each compared FMDV population (79,000 to 80,000 nucleotides per viral population).

Characterization of mutant spectra. The complexity of mutant spectra was characterized by the analysis of the mutation frequency and normalized Shannon entropy, quantified as described previously (4, 36, 47).

Construction of FMDVs containing mutations in 2C. To obtain viruses containing substitutions I85V and I248T in 2C in the genetic background of C-S8c1, plasmid pMT28, which contains a cDNA copy of the entire FMDV genome, was used (25); residues 4027 to 6009 (spanning parts of 2B-, 2C-, 3A-, and 3B-coding regions) were amplified by RT-PCR, and the cDNAs were digested with the restriction enzymes BglII (position 4201) and RsrII (position 5839) (New England Biolabs) and ligated into pMT28 digested with the same enzymes and treated with shrimp alkaline phosphatase (New England Biolabs). Plasmids containing the complete FMDV genome with the mutations in 2C were linearized by digestion with NdeI (position 8140) (New England Biolabs) and transcribed with SP6 RNA polymerase (Promega) according to reference 7. RNA concentrations of infectious transcripts were estimated by agarose gel electrophoresis with known amounts of rRNA from yeast as the standard.

Statistical analyses. Data handling, analysis, and graphic representation was performed using Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical

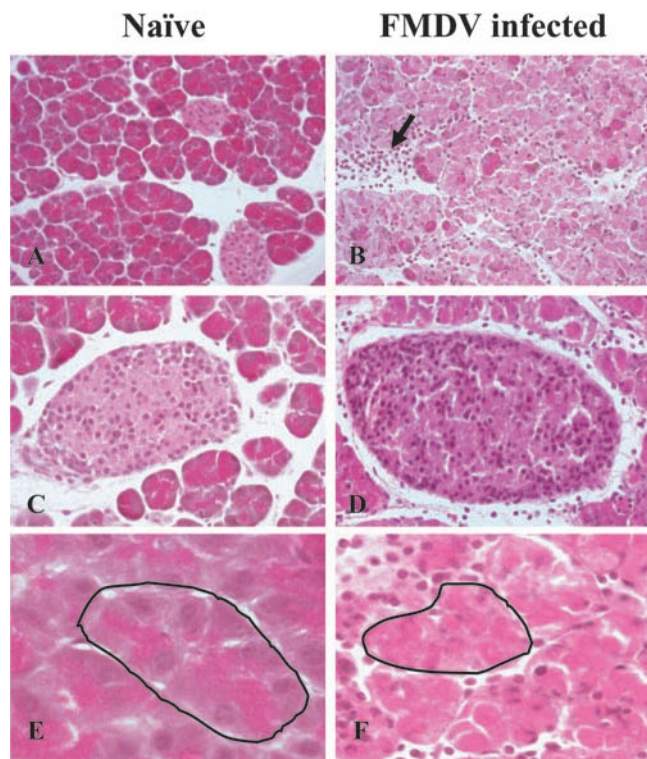


FIG. 1. Histopathology analysis of pancreatic tissue taken from representative C57BL/6 mice that were uninfected (A, C, and E) or that were infected with FMDV C-S8c1 (B, D, and F). Sections from formalin-fixed and paraffin-embedded pancreas samples were stained with hematoxylin and eosin. (A and B) Exocrine and endocrine pancreas. Lymphocytic infiltrates in the infected mice are indicated with an arrow (magnification, $\times 100$). (C and D) The infected mice show a high lymphocytic infiltration in the islets of Langerhans (magnification, $\times 200$). (E and F) Exocrine tissue at higher magnification. Loss of acinar tissue in infected mice; the acinus has been outlined (magnification, $\times 400$).

differences were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) ($P < 0.05$) test or Fisher's exact test ($P < 0.05$).

RESULTS

FMDV causes acute pancreatitis in adult C57BL/6 mice. It has been previously described that FMDV replication in C57BL/6 mice causes a systemic infection resulting in mouse death at 36 to 48 hpi, with a 50% lethal dose of 50 PFU (42). Time course experiments showed virus replication in all major organs (heart, lung, brain, kidney, liver, spleen, pancreas, and thymus). The highest viral load at 24 hpi was observed for pancreas. To understand the effect of viral replication in pancreas, groups of mice were inoculated in parallel in the FP with 10^4 PFU of FMDV C-S8c1, and the consequences of the infection were evaluated. Groups of eight mice were sacrificed by perfusion with PBS at 24 hpi and their pancreases were collected and analyzed (Fig. 1). Macroscopic examination revealed enlarged and edematous pancreases. Histological examination showed acute inflammatory reaction (Fig. 1B) with proteolytic destruction of the pancreatic parenchyma (Fig. 1F), and interstitial hemorrhage, affecting more severely the acinar tissue than the endocrine pancreas. The damage to the acinar

tissue was highly restricted, and the majority of the endocrine pancreas remained less affected than the exocrine pancreas. Nevertheless, mild inflammation in the islets of Langerhans was observed (Fig. 1D), with a high proportion of lymphocyte infiltration in both the endocrine and acinar tissues. These results indicate that the replication of FMDV in mouse pancreas causes a severe pancreatic injury.

Passage of FMDV C-S8c1 in mouse pancreas in vivo. To explore the molecular evolution of FMDV in vivo, and based on our previous observation that FMDV reaches higher levels in pancreas than in other tissues (42), FMDV was passed in mouse pancreas in vivo. With this aim, four mice were inoculated in the FP with 10^4 PFU of FMDV C-S8c1. At 24 hpi mice were bled for viremia detection and sacrificed by perfusion with PBS (mice 1 to 4; Fig. 2) to obtain the pancreases for viral load and infectivity determinations. The amount of PFU per g of pancreas varied among individual mice (with differences of more than $2 \log_{10}$), although all mice showed similar viremias at 24 hpi (mice 1 to 4; Table 1). However, the amounts of viral RNA in pancreases, as quantified by real-time RT-PCR, were similar for all mice tested (Table 1). This indicates a remarkable difference in the specific infectivities of viruses isolated from pancreases among FMDV C-S8c1-infected mice. To ensure that the low specific infectivity values did not reflect a loss of infectivity or the destruction of the viral particles due to the activation of pancreatic enzymes, six C57BL/6 mice were inoculated with FMDV C-S8c1 and sacrificed by perfusion at 24 hpi. Three mice were perfused with a protease inhibitor cocktail (mice 5 to 7, Fig. 2) and three mice with PBS (mice 8 to 10, Fig. 2). The amount of virus in pancreas determined by plaque assay was as variable among mice perfused with the protease inhibitor cocktail as among mice perfused with PBS (mice 5 to 10, Table 1). In addition, and in anticipation that homogenization (or any other mechanical disruption) of the pancreas might produce the activation of pancreatic enzymes, we evaluated the specific infectivity of FMDV C-S8c1 mixed with homogenized pancreases from naïve mice. FMDV C-S8c1 in the homogenized mixture showed a specific infectivity similar to that of FMDV C-S8c1 alone (Table 1). All these data indicate that the specific infectivity found in pancreases of FMDV C-S8c1-infected mice was not affected by pancreatic enzymes.

Viruses isolated from pancreas show an attenuated phenotype for mice. To continue the passage of virus from pancreases in mice, pancreases obtained from mice 1, 2, 8, and 10 (chosen based on the high specific infectivity of virus isolated from their pancreases) and perfused with PBS were homogenized in PBS and inoculated into naïve C57BL/6 mice (passage 2 in Fig. 2). The inoculations were according to the following experimental design: eight mice were inoculated with virus from the pancreas of mouse 1 (group 1 in Fig. 2), four with 10^3 PFU in the FP and four with 10^4 PFU intravenously; four mice were inoculated with 10^4 PFU of virus from the pancreas of mouse 2 in the FP (group 2); eight mice were inoculated with 10^4 PFU of virus from the pancreas of mouse 8 in the FP (group 8); and eight mice were inoculated with 10^4 PFU of virus from the pancreas of mouse 10 in the FP (group 10). The overall survival index of mice inoculated with virus from pancreas was 93.75%, only one mouse from group 2 died at 7 days postinoculation, and the rest of mice from all groups survived during a follow-up period of 30 days (Fig. 3A). By contrast, all

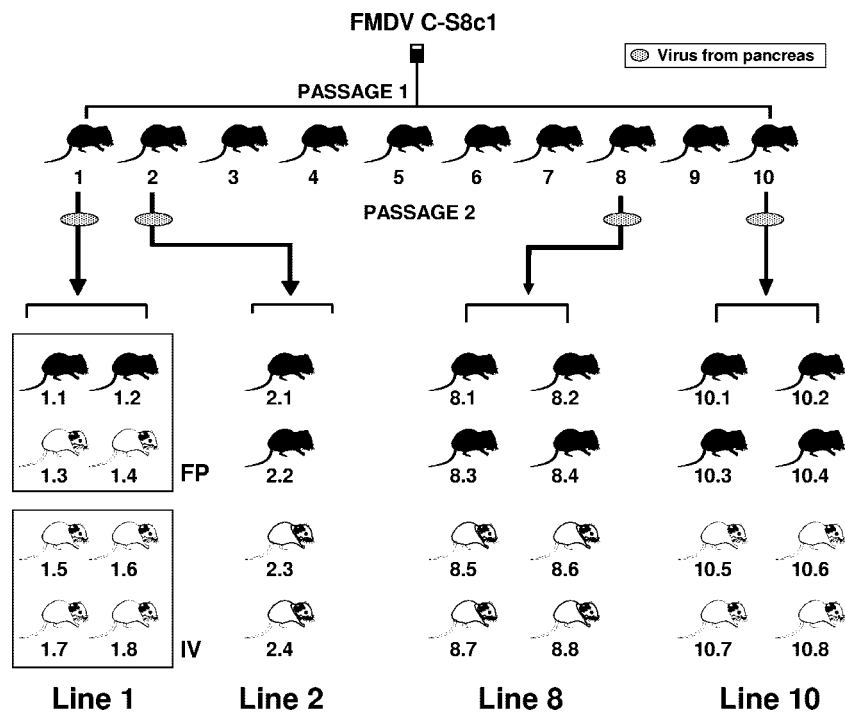


FIG. 2. Experimental design of FMDV C-S8c1 passages in mouse pancreas in vivo. Ten mice were inoculated with 10^4 PFU of FMDV C-S8c1 into the FP (passage 1). Virus isolated from pancreases of mice 1, 2, 8, and 10 were inoculated into naïve mice, as depicted for passage 2. Mice were inoculated with virus from the pancreas of mouse 1 as follows: four mice (1.1, 1.2, 1.3, and 1.4) were inoculated in the FP with 10^5 PFU, and four mice (1.5, 1.6, 1.7, and 1.8) were inoculated intravenously (IV) with 10^4 PFU. All other mice were inoculated with 10^4 PFU from pancreases of mice 2, 8, and 10 in the FP. Inoculated mice are divided in groups 1 to 4. Black mice indicate the animals that were sacrificed at 24 hpi in order to remove the pancreas and other tissues (described in Materials and Methods). White mice were maintained alive for clinical observations or until their sacrifice.

TABLE 1. Viral titers and viral RNA molecules in pancreases and sera from C-S8c1-infected mice

Mouse ^a	Serum viral titer (PFU/ml)	Pancreas		
		Viral titer (PFU/g)	Viral RNA (no. of molecules) ^b	Specific infectivity (PFU/molecule) ^c
1	4.2×10^6	1.3×10^6	8.4×10^{12}	1.5×10^{-7}
2	ND ^e	5.8×10^6	6.2×10^{13}	9.3×10^{-8}
3	5.6×10^7	3.9×10^3	4.3×10^{13}	9.2×10^{-11}
4	6.1×10^7	3.5×10^4	2.3×10^{13}	1.5×10^{-9}
5	1.2×10^8	$<1.0 \times 10^{2d}$	9.2×10^{13}	$<1.1 \times 10^{-12}$
6	ND ^e	5.5×10^4	1.3×10^{12}	4.3×10^{-8}
7	5.2×10^8	1.1×10^7	1.3×10^{14}	8.6×10^{-8}
8	4.3×10^8	2.5×10^6	8.5×10^{13}	2.9×10^{-8}
9	3.8×10^8	5.6×10^4	4.8×10^{13}	1.2×10^{-9}
10	3.1×10^8	1.3×10^8	4.3×10^{13}	3.1×10^{-6}
Control1 ^f		1.1×10^6	3.6×10^{11}	3.2×10^{-6}
Control2 ^f		1.4×10^6	6.7×10^{11}	2.1×10^{-6}
Control3 ^f		6.5×10^6	2.4×10^{12}	2.7×10^{-6}

^a Mouse number according to Fig. 2. Mice 1 to 4 and 8 to 10 were perfused with PBS, and mice 5 to 7 were perfused with a protease inhibitor cocktail.

^b Viral RNA is expressed as the number of RNA molecules quantified by real-time RT-PCR (described in Materials and Methods) per g of tissue.

^c Specific infectivity is expressed as the number of PFU per viral RNA molecule.

^d No PFU were detected in this sample.

^e ND, not determined.

^f Controls 1 and 2 correspond to a mixture of pancreas from naïve mice and 5×10^6 PFU of FMDV C-S8c1. Control 3 is C-S8c1 from the supernatant of infected BHK-21 cells. In these three controls, viral titer is expressed as the number of PFU per ml and viral RNA as the number of RNA molecules per ml.

mice inoculated with 10^4 PFU of the mixture of FMDV C-S8c1 with naïve pancreas died at about 36 hpi (Fig. 3A). To rule out the possibility that pancreatic enzymes (or other virus-inactivating molecules) could be produced as a result of FMDV replicating in the pancreas, resulting in a decrease of infectivity, FMDV C-S8c1 was mixed with a pancreatic extract prepared from FMDV-infected mouse number 4 (Table 1). Mice inoculated with 10^4 PFU of FMDV C-S8c1 in a mixture with pancreatic extract died at about 36 hpi (Fig. 3A), indicating that virus in pancreas was not destroyed by any antiviral activity or pancreatic enzymes that might be activated by the viral infection.

To determine whether the reduced virulence displayed by virus from pancreas at passage 2 corresponded to low viral replication and expansion, samples from serum and pancreas at 24 hpi were titrated by plaque assay. Eleven out of 12 mice sacrificed by perfusion with PBS at 24 hpi showed no viremia (below detection limit [50 PFU/ml of serum]). Mouse 1.2 (Fig. 2) showed a viremia of 3.4×10^4 PFU/ml of serum. The viral infectivity in pancreas was negative by plaque assay for the 12 analyzed mice (below the detection limit of 10^2 PFU/g tissue). To ensure that not even minimal amounts of infectious virus were present in pancreas, infections in liquid medium in BHK-21 cells were carried out with extracts from pancreases 1.1 and 1.2. No infectivity was recovered up to 72 hpi. In addition, the level of viral RNA in pancreatic tissue was determined by RT-PCR. Five out of 12 mice showed viral RNA

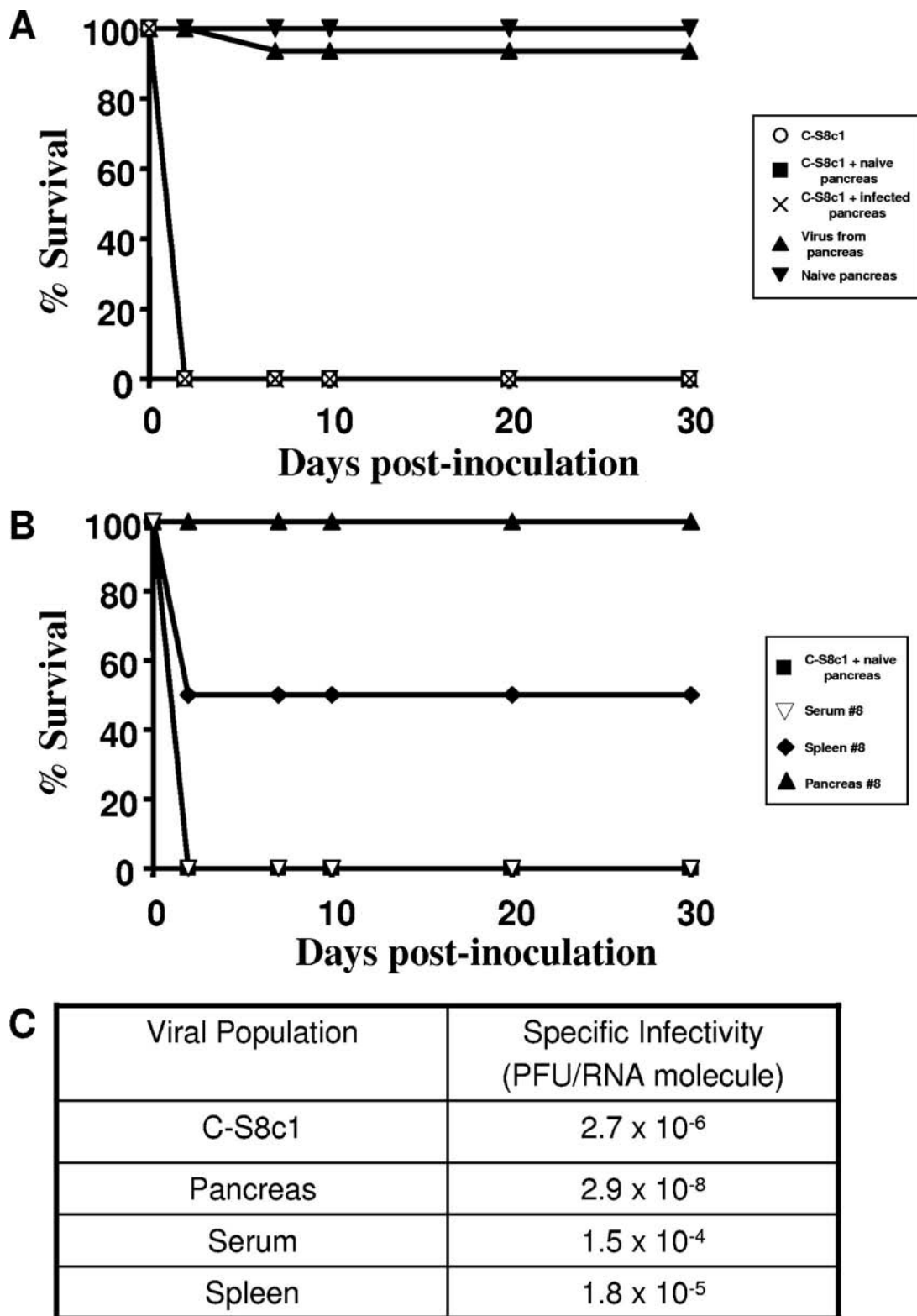


FIG. 3. Virulence for mice of viruses isolated from pancreases, spleens, and sera of FMDV C-S8c1-infected mice. (A) Percentages of survival of mice after inoculation into the FP of 10^4 PFU of FMDV C-S8c1 (4 mice), a mixture of FMDV C-S8c1 with naive pancreas (4 mice), a mixture of FMDV C-S8c1 with infected pancreas of mouse 4 (4 mice), virus from pancreas (16 mice), or naive pancreas (4 mice) during a follow-up period of 30 days. The reduced virulence for mice displayed by viruses from pancreas in relation to C-S8c1, C-S8c1 mixed with naive pancreas, and C-S8c1 mixed with infected pancreas is statistically significant ($P < 0.0001$). (B) Percentages of survival of mice after inoculation into the FP of 10^4 PFU of a mixture of FMDV C-S8c1 with naive pancreas (four mice), virus from the serum of mouse 8 (four mice), virus from the spleen of mouse 8 (four mice), or virus from the pancreas of mouse 8 (four mice) during a follow-up period of 30 days. The differences in virulence of viruses from pancreas, spleen, and serum are statistically significant ($P < 0.0071$). (C) Specific infectivity of C-S8c1 and viral populations from mouse 8 at passage 1, expressed as the number of PFU per viral RNA molecule, determined as described in Materials and Methods.

TABLE 2. Virus detection in pancreases, lungs, hearts, and spleens from mice inoculated with FMDV from mouse pancreas at passage 2

Mouse ^a	Tissue	Viral RNA ^b
1.1	Pancreas	—
	Lung	++
	Heart	—
	Spleen	—
1.2	Pancreas	+++
	Lung	++
	Heart	++
	Spleen	+++
2.1	Pancreas	++
	Lung	++
	Heart	+
	Spleen	++
2.2	Pancreas	+
8.1	Pancreas	—
8.2	Pancreas	+
8.3	Pancreas	—
8.4	Pancreas	+
10.1	Pancreas	—
10.2	Pancreas	—
10.3	Pancreas	—
	Lung	—
	Heart	+
	Spleen	+
10.4	Pancreas	—

^a Mouse numbers are the same as in Fig. 2.^b Viral RNA was detected by RT-PCR amplification of two different genomic regions as described in Materials and Methods. The symbol — means <10⁷ viral RNA molecules per g of tissue, while the symbols +, ++, and +++ correspond to 10⁷ to 10⁸, 10⁸ to 10⁹, and >10⁹ viral RNA molecules per g of tissue, respectively. No virus was detected by plaque assay in any of the samples. The detection limit was 10² PFU per g of tissue.

levels of more than 10⁷ viral RNA molecules per gram of tissue (Table 2), supporting the conclusion that FMDV had replicated in the pancreases of at least 5 mice, although no infectious virus was detected. Since the inoculated virus originated in pancreases of infected mice, the detection of viral RNA in pancreas could indicate a preferential tropism of the virus to replicate in pancreas. To test this possibility, other organs from mice of passage 2 were removed and analyzed for the presence of virus by plaque assay and by RT-PCR. No infectivity was detected in extracts from lungs, hearts, and spleens from mice 1.1, 1.2, 2.1, and 10.3 (Fig. 2), although most of the samples were positive for viral RNA by RT-PCR (Table 2). These data indicate that the virus replicated in all the organs tested and did not show any discernible preferential tropism for pancreas.

Genomic changes in *cre*, L, 2C, and 3A are associated with FMDV replication in mice. To identify genetic characteristics that might be relevant to the reduced pathogenicity displayed by FMDV isolated from pancreas, the entire genomic consensus nucleotide sequence of viruses isolated from the pancreases of 10 mice from passage 1 was determined as described in Materials and Methods. Each viral population analyzed showed nucleotide changes in the consensus nucleotide sequence relative to that for the parental virus, FMDV C-S8c1 (Table 3). Nineteen out of 29 mutations mapped in the region coding for nonstructural proteins, and 12 of these 19 mutations led to an amino acid substitution that affected protein L, 2C, or 3A (Table 3). Amino acid substitutions I85V and I248T in 2C were found repeatedly in virus from several animals (I85V in

TABLE 3. Substitutions found in the consensus sequence of FMDV isolated from pancreas at passage 1 in mice^a

Pancreas of mouse ^b	Nucleotide substitution ^c	Genomic region ^d	Amino acid substitution ^e	Conservation of residue ^f
1	U 879 C	IRES	—	Variable
	U 1358 C	L	I 107→T	Conserved
	C 2439 U	1B	—	
	C 3333 U	1D	—	
2	U 150 A	Fragment S	—	
	C 559 U	<i>cre</i>	—	Conserved
	A 1306 G	L	T 90→A	Conserved
	G 1410 A	L	—	
3	A 4597 G	2C	I 85→V	Conserved
	U 5087 U/C	2C	I 248→T	Variable
	U 7197 C/u	3D	—	
	U 586 C/U	<i>cre</i>	—	Variable
4	A 4597 G/a	2C	I 85→V	Conserved
	C 6570 C/A	3C	—	
5	A 1052 G	L	D 5→G	Variable
	U 5087 C	2C	I 248→T	Variable
	G 5295 A	2C	—	
	C 3494 U	1D	S 96→F	Variable
6	A 5537 G	3A	H 80→R	Variable
	A 3075 A/U	1C	E 175→D	Variable
	A 4597 A/G	2C	I 85→V	Conserved
	A 5609 G/A	3A	Q 104→R	Variable
7	U 5087 C	2C	I 248→T	Variable
	U 6474 C	3C	—	
	U 6702 C	3D	—	
	A 4597 G	2C	I 85→V	Conserved
8	C 6096 U	3C	—	
	C 1746 U/C	1A	—	
	C 3653 A/c	1D	T 149→K	Variable

^a The complete genomes of FMDV populations from pancreas of passage 1 in mice were amplified by RT-PCR and sequenced as described in Materials and Methods. Repeated mutations are shown in the same typeface (boldface or italic); boldface indicates an amino acid change in a variable residue, while italic indicates an amino acid change in a conserved residue.^b Mouse numbers 1 to 10 correspond to the mouse numbers shown in Fig. 2.^c The numbering of residues was done according to reference 50. Lowercase letters indicate the presence of a minority nucleotide (<50 %) according to the sequencing peak pattern.^d The genomic region corresponding to each mutation is indicated.^e Dashes indicate mutations that do not give rise to amino acid substitutions.^f The conservation of the substituted nucleotide or amino acid in other FMDV isolates is according to reference 21.

four mice, and I248T in three mice). However, these substitutions were never found together in the same viral population. These data suggest a role of the 2C protein in FMDV replication in mice.

To further investigate the molecular basis of FMDV adaptation to mice, virus was isolated from several organs of FMDV C-S8c1-infected mice. Spleens, lungs, and hearts were taken from mice 1, 2, 8, and 10 (Fig. 2) and homogenized. The consensus sequences from the viral population isolated from these organs were determined for the genomic regions *cre*, internal ribosome entry site (IRES), L, 2C, and 3A, as indicated in Materials and Methods. Most of the mutations found in these genomic regions correspond to the mutations found in the viral populations from the pancreas of the corresponding animal (Table 4). In addition, amino acid substitutions I85V and I248T found in 2C were present also in viral populations from organs other than the pancreas. Therefore, the 2C protein may play a role in FMDV replication generally in mice and not specifically in the pancreas.

TABLE 4. Mutations found in the consensus sequence of FMDV populations from lungs, hearts, and spleens of passage 1 mice^a

Mouse ^b	Organ ^c	Nucleotide substitution ^d	Genomic region ^e	Amino acid substitution ^f	Conservation of residue ^g
1	Lung	U 5480 C	3A	I 61→T	Variable
	Spleen	A 641 A/g	IRES	—	Variable
2	Lung	U 5480 C/U	3A	I 61→T	Variable
		C 559 C/U	<i>cre</i>	—	Conserved
		A 1306 A/G	L	T 90→A	Conserved
		G 1410 G/A	L	—	—
		G 1588 G/A	L	D 184→N	Conserved
	Heart	<i>A 4597 A/G</i>	2C	<i>I 85→V</i>	Conserved
		C 559 C/U	<i>cre</i>	—	Conserved
		A 1306 A/g	L	T 90→A	Conserved
		G 1410 G/a	L	—	—
		G 1588 G/A	L	D 184→N	Conserved
	Spleen	<i>A 4597 A/G</i>	2C	<i>I 85→V</i>	Conserved
		C 559 C/U	<i>cre</i>	—	Conserved
		A 1306 A/G	L	T 90→A	Conserved
		G 1410 G/A	L	—	—
		G 1588 G/A	L	D 184→N	Conserved
8	Lung	U 5087 C	2C	I 248→T	Variable
	Heart	U 5087 C	2C	I 248→T	Variable
	Spleen	U 5087 C	2C	I 248→T	Variable
10	Lung	—	—	—	—
	Heart	—	—	—	—
	Spleen	—	—	—	—

^a The consensus sequences of the genomic regions *cre*, IRES, L, 2C, and 3A of FMDV populations from lungs, hearts, and spleens from passage 1 mice are represented. Residues 389 to 1641 and 4345 to 5757 were analyzed for all mice except mouse number 1, for which only residues 389 to 1095 and 4345 to 5757 from lung and spleen could be amplified by RT-PCR. Repeated mutations are shown with the same typeface (boldface or italic): boldface indicates an amino acid change in a variable residue, while italic indicates an amino acid change in a conserved residue.

^b Mouse numbers 1, 2, 8, and 10 correspond to the mouse numbers shown in Fig. 2.

^c Organs from which viral RNA was amplified by RT-PCR and sequenced (described in Materials and Methods).

^d See Table 3 footnote c.

^e See Table 3 footnote d.

^f See Table 3 footnote e.

^g See Table 3 footnote f.

To study a possible relationship between substitutions I85V or I248T in 2C and FMDV virulence for mice, two infectious transcripts of FMDV C-S8c1 (termed C-S8c1 V-85 and C-S8c1 T-248, each carrying one of the two mutations in the 2C-coding region) were obtained from plasmid pMT28, as detailed in Materials and Methods. Infectious viruses harvested after two serial passages in BHK-21 cells of the supernatants from transfected BHK-21 cells with the infectious transcripts maintained each of the substitutions in 2C. The phenotypic properties of the resulting viruses were studied in vitro and in vivo. The viral titer of the two newly generated mutant viruses was similar to that of the parental virus infectious transcript, C-S8c1 pMT28. Their virulence in vivo was determined by inoculation of C57BL/6 mice in the FP with 10⁴ PFU. No statistically significant differences in mouse survival at 48 hpi were observed for C-S8c1 V-85, C-S8c1 T-248, and C-S8c1 pMT28 (*P* > 0.05) (Table 5). Furthermore, the inoculated animals with each of the infectious transcripts carrying one of the mutations in 2C showed pathological signs similar to those observed for the infection with C-S8c1. This result excluded the association of

TABLE 5. Similar phenotypic properties of infectious viruses recovered from FMDV C-S8c1 V-85 and C-S8c1 T-248 transcripts

FMDV population	Viral titer (PFU/ml) ^a	% Survival (no. of surviving mice/no. inoculated) ^b
C-S8c1 V-85	1.5 × 10 ⁷	25 (1/4)
C-S8c1 T-248	1.6 × 10 ⁷	0 (0/4)
C-S8c1 pMT28	2.3 × 10 ⁷	0 (0/4)

^a Viral titers of viruses obtained after two serial passages in BHK-21 cells for the supernatant of BHK-21 cells transfected with infectious clone transcripts.

^b Virulence in mice is expressed as the percentage of mice that were alive at 48 hpi. No statistically significant differences between the survivals of mice at 48 hpi were noted among the three viral populations analyzed (one-way ANOVA; *P* < 0.05).

point mutations in 2C with the attenuated phenotype found in virus isolated from pancreases of C-S8c1-infected mice.

Viral populations from spleen and serum are pathogenic for mice. To investigate whether other viral populations from mice inoculated with FMDV C-S8c1 also showed an attenuated phenotype, the capacity of virus isolated from the spleen and sera of FMDV C-S8c1-infected mice to spread, cause disease, and kill mice was monitored (Fig. 3). The complete consensus nucleotide sequence of virus isolated from serum of mouse number 8 (Fig. 2) was identical to the consensus sequence of the genome from viruses from pancreas isolated from the same mouse (data not shown). Mice infected with virus from serum showed symptoms similar to those seen for mice infected with C-S8c1, and all mice died between 36 and 48 hpi. Mice inoculated with virus from pancreas showed 100% survival and mice inoculated with virus from spleen presented 50% survival at the same viral dose (Fig. 3B). To investigate the origin of these differences in virulence among viruses, the specific infectivity was determined. The three viruses displayed differences in specific infectivity, with viruses from pancreas having the lowest value (Fig. 3C). Thus, the low specific infectivity of viral populations isolated from mouse organs with respect to viruses isolated from serum might be associated with the attenuation of FMDV for mice. However, this possibility will require further study because C-S8c1, even when subjected to passages in BHK-21 cells, can vary its specific infectivity by orders of magnitude (23) (R. Agudo and E. Domingo, unpublished results). These results indicate that viruses isolated from different tissues of the same mouse, despite having the same consensus genomic nucleotide sequence, display remarkably different phenotypes in vivo.

Genomic diversity of viral populations from serum, spleen, and pancreas. To determine whether the quasispecies complexity of the viral populations isolated from spleen, serum, and pancreas of mouse number 8 (Fig. 2) could explain the differing virulences for mice displayed by these viruses, the mutation frequencies of their mutant spectra were compared. Seventy-four or 75 cDNA clones from the VP1- and 2C-coding regions of viruses from spleen, pancreas, and serum (approximately 80,000 nucleotides per viral population) were sequenced without virus adaptation to cell culture (see Materials and Methods). There were no statistically significant differences among the mutation frequencies of these three viral populations (Table 6). The normalized Shannon entropy val-

TABLE 6. Complexities of the mutant spectra of FMDV populations from serum, pancreas, and spleen of mouse 8 at passage 1

Virus population	Molecular cloning			Biological cloning		
	Substitutions/nucleotide (mutation frequency) ^a	Normalized Shannon entropy ^b	NS/S ^c	Substitutions/nucleotide (mutation frequency) ^d	Normalized Shannon entropy ^e	NS/S ^c
Serum	15/79,188 (1.9×10^{-4})	0.224	10/5 (2)	4/40,575 (9.9×10^{-5})	0.826	1/1 (1)
Pancreas	14/80,602 (1.7×10^{-4})	0.172	10/4 (2.5)	3/40,575 (7.4×10^{-5})	0.826	1/2 (0.5)
Spleen	24/80,602 (3×10^{-4})	0.259	19/5 (3.8)	ND ^f	ND ^f	ND ^f

^a The mutation frequency is the number of different mutations divided by the total number of nucleotides sequenced. To determine the mutation frequency in each viral population, 74 or 75 cDNA clones were analyzed. There were no significant differences between the mutation frequencies for the three viral populations analyzed (one-way ANOVA; $P < 0.05$).

^b Normalized Shannon entropy is a measure of the proportion of identical sequences in a distribution (57). To calculate the normalized Shannon entropy, residues 4364 to 5306 of each viral molecular clone were analyzed. Numbering of residues is as in reference 50.

^c NS/S, ratio between nonsynonymous and synonymous mutations. The corresponding numerical value is shown in parentheses.

^d Mutation frequency calculated with the entire genomic nucleotide sequence of five biological clones from serum and five biological clones from pancreas. There were no significant differences between the mutation frequencies of these two viral populations (one-way ANOVA; $P < 0.05$).

^e Normalized Shannon entropy determined with the entire genomic nucleotide sequences of five biological clones from serum and of five biological clones from pancreas.

^f ND, not determined.

ues were also similar for all viral populations analyzed. Moreover, the complete genomic nucleotide sequences from five biological clones from the virus isolated from pancreas and five from biological clones from the virus isolated from serum were determined, and mutation frequency and normalized Shannon entropy were calculated (Table 6). Again, the viral populations from serum and pancreas did not exhibit any significant difference in mutant spectrum complexity. These data suggest that the different phenotypes shown in mice by these viral populations cannot be attributed to a difference of genomic diversity in the viral populations.

Differential quasispecies genome composition in virus from pancreas and serum determines viral phenotype in vivo. We hypothesized that a different quasispecies genome composition, not reflected in mutant spectrum complexity, was the determinant of viral virulence in vivo. To test whether viral subpopulations within serum and pancreas could be distinguished by differences in their replications in BHK-21 cells, viral RNA from serum or pancreas from mice 8 and 10 was transfected into BHK-21 cells. RNA transfection was chosen to avoid any possible change in quasispecies composition due to selective viral entry into BHK-21 cells. A positive control transfected with C-S8c1 RNA was included in the assay. Extracellular virus was collected either at early times (24 to 36 h) posttransfection (when cytopathology affected 20% of BHK-21 cells) or late times (48 to 69 h) posttransfection (when cytopathology was complete). The viruses rescued at early and late times posttransfection were tested for their virulence in mice (Table 7). A significant increase in survival of mice was noted for RNA from pancreas harvested at late times posttransfection ($P < 0.0001$). To determine whether the intracellular virus population at early times posttransfection differed from the extracellular virus in terms of virulence, intracellular virus was harvested by freeze-thawing of BHK-21 cells transfected with RNA either from serum or pancreas or from C-S8c1. The data indicate (Table 7) that there is no significant difference between the virulences for mice of the extracellular and intracellular viral populations. Thus, the late subpopulation of virus derived from pancreas, but not the corresponding early subpopulations (intracellular as well as intracellular viral populations) derived from pancreases of the same animals, repro-

duced the attenuated phenotype for mice. Interestingly, no differences among the consensus nucleotide sequences of the entire viral genomes from the early and late viral subpopulations were observed (data not shown). Therefore, a differential rate of replication upon transfection of BHK-21 cells captured the difference in virulence for mice of the two subpopulations. Yet, no genomic signature could be associated with the attenuated phenotype.

DISCUSSION

Quasispecies dynamics of FMDV has been extensively studied in cell culture (reviewed in reference 17). However, very few studies have addressed quasispecies dynamics of FMDV in vivo. In an early evidence of quasispecies, two closely related variants of FMDV were identified in the same infected animal

TABLE 7. Virulence for mice of FMDV rescued at early or late times upon transfection of BHK-21 cells with viral RNA

Viral RNA ^a	Extent of CPE (%) ^b	Virulence for mice: % survival (no. surviving/no. inoculated) at 48 hpi ^c	
		Intracellular virus population	Extracellular virus population
C-S8c1	20	25 (1/4)	0 (0/6)
	100	0 (0/8)	
Serum 8	20	0 (0/4)	0 (0/6)
	100	0 (0/4)	
Serum 10	20	ND ^d	0 (0/6)
	100	0 (0/8)	
Pancreas 8	20	0 (0/4)	17 (1/6)
	100	75 (3/4) ^e	
Pancreas 10	20	0 (0/8)	17 (1/6)
	100	100 (8/8) ^e	

^a Viral RNA was extracted either from C-S8c1 (control) or from sera or pancreases of mice 8 and 10 (as shown in Fig. 2) and used to transfect BHK-21 cells to rescue infectious particles, as described in Materials and Methods.

^b Virus was collected from the supernatant of transfected cells when the cytopathic effect (CPE) affected 20% (24 to 36 h posttransfection) or 100% (48 to 69 h posttransfection) of BHK-21 cells.

^c Mice were inoculated in the FP with 10^4 PFU of the virus harvested after transfection.

^d ND, not determined.

^e These viruses show significant decreased virulence in mice (Fisher's exact test; $P < 0.05$) in relation to the other viral populations shown in this table.

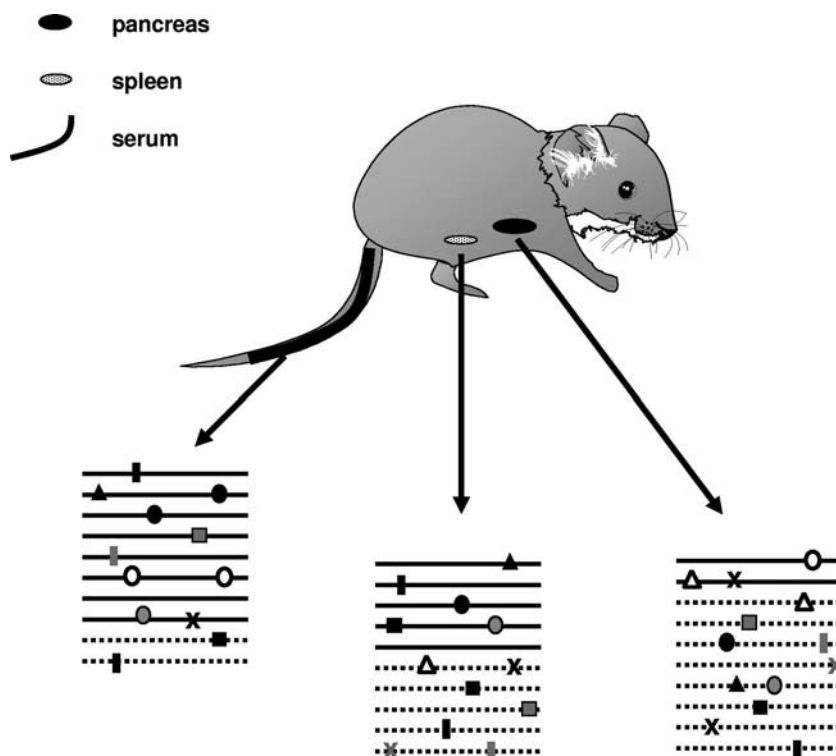


FIG. 4. Model of the interplay between different variants from the FMDV quasispecies as a determinant of an in vivo phenotype. Lines represent viral genomes, and symbols on the lines represent mutations. Viral populations isolated from the pancreas, spleen, or serum of a mouse are composed of “pathogenic” (black line) and “nonpathogenic” (dashed line) genomes in different proportions. A higher proportion of “pathogenic” than of “nonpathogenic” genomes (serum) would result in virulence for mice. An intermediate proportion of “pathogenic” and “nonpathogenic” genomes (spleen) would result in an intermediate virulence for mice. A quasispecies composed of a higher proportion of “nonpathogenic” than of “pathogenic” genomes would result in attenuation in mice (virus from pancreas).

in cattle (15). Adaptation of a swine FMDV isolate to guinea pigs occurred through heterogeneous viral populations, ending in the fixation of a critical substitution in nonstructural protein 3A (33). In a recent study, serial contact transmission of FMDV in pigs (equivalent to plaque-to-plaque transfer in cell culture [17]) led to reduction of virulence and interruption of transmission, despite the persistence of virus in the animals (8). In none of the above studies were FMDV subpopulations from different organs compared genetically or phenotypically. This report provides experimental evidence that viral quasispecies in vivo may comprise multiple FMDV subpopulations that evolve independently in different tissues within the same infected host. Tissues introduce distinct selective pressures and may represent population bottlenecks to viral spread, with a reduction of quasispecies complexity (24, 38). However, our data indicate that the quasispecies complexity of FMDV can be maintained upon viral replication in different tissues. In addition, biologically very significant differences in viral phenotype were observed among populations presenting identical consensus sequences and indistinguishable mutant spectrum complexities, as determined both by mutation frequency and by normalized Shannon entropy of specific genomic regions and the entire genome sequence of biological clones. These results are consistent with a model in which virus phenotype (virulence in mice) may be determined by the interplay between different variants within the quasispecies that may or may not facilitate

expansion and replication in mice, without the requirement of a specific genetic signature associated with virulence (Fig. 4).

Anatomical sequestration of virus populations may provide a biological niche that could lead to the subdivision of the viral quasispecies into smaller, semi-isolated groups that differ in terms of phenotype and/or selective advantage. Our study was undertaken to investigate specific tissue and cell type factors that may contribute to the selection of such variants. FMDV C-S8c1 showed a propensity to invade the mouse pancreas at 24 hpi (42), resulting in acute pancreatic inflammation and the loss of pancreatic acinar tissue (Fig. 1A). Different mice had equivalent viral loads at 24 hpi but displayed differences of from 1 to more than 5 logarithmic units in specific infectivity. Specific infectivities for FMDV C-S8c1 with a history of passages in BHK-21 cells are in the range from 1×10^{-4} to 4×10^{-9} PFU/RNA molecule (23, 56). Therefore, it is not surprising that even lower specific infectivity values are scored for C-S8c1 after replication in mice, when measured in BHK-21 cells (Fig. 3 and Table 1). Thus, further research would be needed to attribute the phenotypic behavior to the specific infectivity of the virus. When virus from pancreas was inoculated into naïve mice, the virus showed an attenuated phenotype, with low mortality even at the highest viral dose used (10^4 PFU). Interestingly, the virus spread and replicated in all major organs, including the pancreas, suggesting that virus from the pancreas did not show discernible preferential tropism for

the pancreas. A similar phenomenon has been described for cytomegalovirus in which the cell type producing the most virus (hepatocytes) was not necessarily the one responsible for virus dissemination within the host (41). Thus, it appears that the difference between FMDV C-S8c1 and its progeny from pancreas with regard to virulence for mice lies at a level different from their mere abilities to replicate in certain mouse tissues.

The basis for the striking differences in virulence between C-S8c1 and its pancreatic derivatives was analyzed at the molecular level. The molecular characterization of pancreas viruses revealed several mutations, and I85V and I248T in 2C were found for several mice. These two substitutions were also found for other organs from the same mice (spleen, lung, and heart), suggesting a relevance of these two positions in 2C in the adaptation of FMDV to enable replication in mice. Mutations in 2C have been found upon adaptation of FMDV and other picornaviruses to different environments in cell culture and in vivo (6, 8, 20, 21, 28, 33, 38, 46, 59). Their possible biological significance is under study.

The changes found in the *cre* region and in the L and 3A proteins in FMDV populations isolated from pancreas, spleen, heart, and lung point out an influence of these genomic regions on FMDV replication in mice. It is interesting that in the *cre* region, a relatively small genomic region comprising only 54 nucleotides, two nucleotide changes (C559U and U586C) were found, located in the stem region of *cre*, which has been described as very important for replication (31). The application of the Mfold program (59) indicated that both substitutions caused an increase of Gibbs free energy in the predicted structure and that the change U586C generated a mispaired stem structure.

The various organs and cell types in an organism provide a rich milieu for the selection of viral variants, as evidenced, for example, by the presence of genetically distinct subpopulations of HIV-1 in different organs and even in different regions within the same organ (46, 54, 55, 58). It cannot be excluded, however, that some of the mutations scored in these studies may have resulted from genetic drift. Many examples have documented that a single point mutation may lead to important changes in the biology of diverse viruses (for examples, see references 1, 6, 14, 43, 49, and 51). Our study underscores, however, important phenotypic changes among viral populations in an individual mouse, with no detectable changes in the consensus sequences or in the complexity of the mutant spectra. Furthermore, the molecular and biological cloning analysis showed no differences among viruses from serum, pancreas, and spleen or in other parameters such as the ratio of nonsynonymous and synonymous mutations or the number of transitions and transversions in each viral population, pointing to factors in viral pathogenesis that may go unnoticed by our current methods to probe viral genome populations. One possibility is that attenuation was prompted by the limited capsid stability of the virus assembled in the pancreas. However, this is unlikely to be a major contributing factor because virus rescued at late times after transfection of BHK-21 cells maintains its attenuated phenotype.

Our current hypothesis is that the FMDV quasispecies from spleen, pancreas, and serum are composed of “nonpathogenic” genomes and “pathogenic” genomes in different proportions (Fig. 4). The molecular basis for how the interplay between

different genomes may lead to a virulent or an attenuated population is unknown, but several possible mechanisms have been previously documented. A subset of “nonpathogenic” genomes can suppress the “pathogenic” genomes, as previously evidenced with attenuated and virulent poliovirus in vaccine preparations (11) or with the suppression of growth hormone deficiency syndrome associated with lymphocytic choriomeningitis virus infection by disease-negative virus variants (52). An alternative mechanism is that complementation among subsets of genomes is needed for pathology and that this requires minimum levels of some genome subsets. Complementation of a specific poliovirus mutant by a spectrum of mutants was required for the mutant to reach the brains of susceptible mice (57). In the case of FMDV, the so-called “nonpathogenic” genomes would reach the pancreas in a higher proportion than “pathogenic” genomes, although the latter might replicate faster at early stages of the infection and be poured into the bloodstream, enriching the circulating quasispecies with a higher proportion of “pathogenic” genomes. This hypothesis was supported by our transfection data, in which RNA from pancreas transfected in BHK-21 cells and harvested at short times posttransfection was pathogenic for mice, while the virus harvested at later times posttransfection was nonpathogenic for mice. The pathogenic versus nonpathogenic subpopulations distinguished by the time after transfection of BHK-21 cells did not correspond to a compartmentalization of intracellular versus extracellular virus. Indeed, intracellular virus (particles that were assembled at 24 to 36 h posttransfection) was as virulent for mice as virus shed from the cells at such times posttransfection. This suggests, again, that attenuation corresponds to subsets of genomes that replicate and assemble at later times. This is consistent with the hypothesis that the viral quasispecies at times shortly after posttransfection were enriched in subsets of genomes that we describe as “pathogenic,” relative to their “nonpathogenic” counterparts, whereas at late times posttransfection the quasispecies was dominated by “nonpathogenic” genomes. Suppressive effects of mutant spectra have also been documented for FMDV and other viruses in cell culture and in vivo (13, 26, 37, 52). New techniques such as microarray analyses or a more exhaustive survey of individual genomes through pyrosequencing-based methodologies might help to discern the so-called “nonpathogenic” from “pathogenic” subpopulations of genomes in a quasispecies by some genetic signature that cannot be identified from the nucleotide sequences of limited numbers of genomes.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants AGL2004-0049 and BFU2005-00863 from Ministerio de Educación y Ciencia, Spain; by the EU, Network of Excellence, EPIZONE (contract no. FOOD-CT-2006-016236); and by Fundación Ramón Areces. CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III. M.S.-R. was supported by an FPU fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia. F.D.-S.S. was supported by a fellowship from INIA (Spain).

REFERENCES

- Ahmed, R., and M. B. Oldstone. 1988. Organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J. Exp. Med.* **167**:1719–1724.
- Airaksinen, A., N. Pariente, L. Menendez-Arias, and E. Domingo. 2003. Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**:339–349.

3. Ali, A., H. Li, W. L. Schneider, D. J. Sherman, S. Gray, D. Smith, and M. J. Roossinck. 2006. Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of *Cucumber mosaic virus*. *J. Virol.* **80**:8345–8350.
4. Arias, A., E. Lazaro, C. Escarmis, and E. Domingo. 2001. Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J. Gen. Virol.* **82**:1049–1060.
5. Bachrach, H. L. 1978. Foot-and-mouth disease: world-wide impact and control measures, p. 299–310. In E. Kurstak and K. Maramorosch (ed.), *Viruses and environment*. Academic Press, Inc., New York, NY.
6. Bae, Y. S., and J. W. Yoon. 1993. Determination of diabetogenicity attributable to a single amino acid, Ala776, on the polyprotein of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* **42**:435–443.
7. Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguier, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck, and E. Domingo. 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* **72**:6362–6372.
8. Carrillo, C., Z. Lu, M. V. Borca, A. Vagnozzi, G. F. Kutish, and D. L. Rock. 2007. Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J. Virol.* **81**:11341–11351.
9. Ciota, A. T., K. A. Ngo, A. O. Lovelace, A. F. Payne, Y. Zhou, P. Y. Shi, and L. D. Kramer. 2007. Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **88**:865–874.
10. Chao, L. 1990. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**:454–455.
11. Chumakov, K. M., L. B. Powers, K. E. Noonan, I. B. Roninson, and I. S. Levenbook. 1991. Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:199–203.
12. Cline, J., J. C. Braman, and H. H. Hogrefe. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**:3546–3551.
13. de la Torre, J. C., and J. J. Holland. 1990. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J. Virol.* **64**:6278–6281.
14. Dietzschold, B., W. H. Wunner, T. J. Wiktor, A. D. Lopes, M. Lafon, C. L. Smith, and H. Koprowski. 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:70–74.
15. Domingo, E., M. Davila, and J. Ortin. 1980. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**:333–346.
16. Domingo, E., V. Martin, C. Perales, A. Grande-Perez, J. Garcia-Arriaza, and A. Arias. 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**:51–82.
17. Domingo, E., C. M. Ruiz-Jarabo, A. Arias, and C. Escarmis. 2004. Quasispecies dynamics and evolution of foot-and-mouth disease virus, p. 261–304. In F. Sobrino and E. Domingo (ed.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, England.
18. Duarte, E., D. Clarke, A. Moya, E. Domingo, and J. Holland. 1992. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:6015–6019.
19. Eigen, M. 1993. Viral quasispecies. *Sci. Am.* **269**:42–49.
20. Emerson, S. U., Y. K. Huang, H. Nguyen, A. Brockington, S. Govindarajan, M. St Claire, M. Shapiro, and R. H. Purcell. 2002. Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C. *J. Virol.* **76**:8551–8559.
21. Escarmis, C., M. Davila, N. Charpentier, A. Bracho, A. Moya, and E. Domingo. 1996. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J. Mol. Biol.* **264**:255–267.
22. Escarmis, C., M. Davila, and E. Domingo. 1999. Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J. Mol. Biol.* **285**:495–505.
23. Escarmis, C., E. Lazaro, A. Arias, and E. Domingo. 2008. Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: implications for viral extinction. *J. Mol. Biol.* **376**:367–379.
24. Escarmis, C., E. Lazaro, and S. C. Manrubia. 2006. Population bottlenecks in quasispecies dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **299**:141–170.
25. Garcia-Arriaza, J., S. C. Manrubia, M. Toja, E. Domingo, and C. Escarmis. 2004. Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J. Virol.* **78**:11678–11685.
26. Gonzalez-Lopez, C., A. Arias, N. Pariente, G. Gomez-Mariano, and E. Domingo. 2004. Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J. Virol.* **78**:3319–3324.
27. Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol, and S. Vande-Pol. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**:1577–1585.
28. Hu, N. Z., Y. Z. Hu, H. J. Shi, G. D. Liu, and S. Qu. 2002. Mutational characteristics in consecutive passage of rapidly replicating variants of hepatitis A virus strain H2 during cell culture adaptation. *World J. Gastroenterol.* **8**:872–878.
29. Jerzak, G. V., K. Bernard, L. D. Kramer, P. Y. Shi, and G. D. Ebel. 2007. The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. *Virology* **360**:469–476.
30. Li, H., and M. J. Roossinck. 2004. Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *J. Virol.* **78**:10582–10587.
31. Mason, P. W., S. V. Bezborodova, and T. M. Henry. 2002. Identification and characterization of a *cis*-acting replication element (*cre*) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **76**:9686–9694.
32. Muller, H. J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* **106**:2–9.
33. Nunez, J. I., E. Baranowski, N. Molina, C. M. Ruiz-Jarabo, C. Sanchez, E. Domingo, and F. Sobrino. 2001. A single amino acid substitution in non-structural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. *J. Virol.* **75**:3977–3983.
34. Pariente, N., A. Airaksinen, and E. Domingo. 2003. Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **77**:7131–7138.
35. Pariente, N., S. Sierra, P. R. Lowenstein, and E. Domingo. 2001. Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J. Virol.* **75**:9723–9730.
36. Pawlotsky, J. M., G. Germanidis, A. U. Neumann, M. Pellerin, P. O. Fraenkel, and D. Dhumeaux. 1998. Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J. Virol.* **72**:2795–2805.
37. Perales, C., R. Mateo, M. G. Mateu, and E. Domingo. 2007. Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J. Mol. Biol.* **369**:985–1000.
38. Pfeiffer, J. K., and K. Kirkegaard. 2006. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:5520–5525.
39. Pfeiffer, J. K., and K. Kirkegaard. 2005. Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* **1**:e11.
40. Brown, F. 2003. The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Res.* **91**:3–7.
41. Sacher, T., J. Podlech, C. A. Mohr, S. Jordan, Z. Ruzsics, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski. 2008. The major virus-producing cell type during murine cytomegalovirus infection, the hepatocyte, is not the source of virus dissemination in the host. *Cell Host Microbe* **3**:263–272.
42. Salguero, F. J., M. A. Sanchez-Martin, F. Diaz-San Segundo, A. de Avila, and N. Sevilla. 2005. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology* **332**:384–396.
43. Salvato, M., P. Borrow, E. Shimomaye, and M. B. Oldstone. 1991. Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J. Virol.* **65**:1863–1869.
44. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
45. Sanchez, G., A. Bosch, G. Gomez-Mariano, E. Domingo, and R. M. Pinto. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* **315**:34–42.
46. Shapshak, P., D. M. Segal, K. A. Crandall, R. K. Fujimura, B. T. Zhang, K. Q. Xin, K. Okuda, C. K. Petito, C. Eisdorfer, and K. Goodkin. 1999. Independent evolution of HIV type 1 in different brain regions. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **15**:811–820.
47. Sierra, M., A. Airaksinen, C. Gonzalez-Lopez, R. Agudo, A. Arias, and E. Domingo. 2007. Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J. Virol.* **81**:2012–2024.
48. Sierra, S., M. Davila, P. R. Lowenstein, and E. Domingo. 2000. Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J. Virol.* **74**:8316–8323.
49. Sitbon, M., L. d'Auriol, H. Ellerbrok, C. Andre, J. Nishio, S. Perryman, F. Pozo, S. F. Hayes, K. Wehrly, P. Tambourin, et al. 1991. Substitution of leucine for isoleucine in a sequence highly conserved among retroviral envelope surface glycoproteins attenuates the lytic effect of the Friend murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5932–5936.
50. Sobrino, F., M. Davila, J. Ortin, and E. Domingo. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**:310–318.
51. Szepeanski, S., H. J. Gross, R. Brossmer, H. D. Klenk, and G. Herrler. 1992. A single point mutation of the influenza C virus glycoprotein (HEF) changes the viral receptor-binding activity. *Virology* **188**:85–92.
52. Teng, M. N., M. B. Oldstone, and J. C. de la Torre. 1996. Suppression of lymphocytic choriomeningitis virus-induced growth hormone deficiency syndrome by disease-negative virus variants. *Virology* **223**:113–119.
53. Toja, M., C. Escarmis, and E. Domingo. 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res.* **64**:161–171.
54. van Rij, R. P., H. Blaak, J. A. Visser, M. Brouwer, R. Rientsma, S. Broersen, A. M. de Roda Husman, and H. Schuitemaker. 2000. Differential coreceptor

- expression allows for independent evolution of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV-1. *J. Clin. Investig.* **106**:1569.
55. **van't Wout, A. B., L. J. Ran, C. L. Kuiken, N. A. Kootstra, S. T. Pals, and H. Schuitemaker.** 1998. Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quaspecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J. Virol.* **72**:488–496.
56. **Verdaguer, N., I. Fita, E. Domingo, and M. G. Mateu.** 1997. Efficient neutralization of foot-and-mouth disease virus by monovalent antibody binding. *J. Virol.* **71**:9813–9816.
57. **Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron, and R. Andino.** 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**:344–348.
58. **Wong, J. K., C. C. Ignacio, F. Torriani, D. Havlir, N. J. Fitch, and D. D. Richman.** 1997. In vivo compartmentalization of human immunodeficiency virus: evidence from the examination of *pol* sequences from autopsy tissues. *J. Virol.* **71**:2059–2071.
59. **Zuker, M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**:3406–3415.